

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

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS SECOS REDISPERSÍVEIS A PARTIR DE
NANOESTRUTURAS CONTENDO TIOCONAZOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roseane Fagundes Ribeiro

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
SECOS REDISPERSÍVEIS A PARTIR DE
NANOESTRUTURAS CONTENDO TIOCONAZOL**

Roseane Fagundes Ribeiro

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Scheila Rezende Schaffazick

**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 TECNOLÓGICO DE PRODUTOS SECOS
REDISPERSÍVEIS A PARTIR DE NANOESTRUTURAS CONTENDO
TIOCONAZOL**

elaborada por
Roseane Fagundes Ribeiro

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Sílvia Stanisçuaski Guterres, Dra. (UFRGS)

Leticia Cruz, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 29 de abril de 2013.

*Dedico esta realização à minha família,
pelo amor, carinho, compreensão,
exemplo de vida e apoio incondicional
que sempre me foram dados.*

AGRADECIMENTOS

Há poucos dias assisti a um filme chamado “O Grande milagre”, baseado em fatos reais, ocorrido no ano de 1988, sobre o resgate de uma família de baleias que ficou presa sob o gelo do Ártico. Inconformados com a situação, um repórter e uma ativista do Greenpeace juntaram forças; com a colaboração dos nativistas que ali viviam, com o seu país, EUA, e um país vizinho, a Rússia; onde se envolveram com fé, luta e dedicação na busca por salvar as baleias. Foi com sucesso que estas se libertaram, através do rompimento das geleiras, e logo submergiram sob as águas com vida e felizes, ao mesmo tempo em que foram desaparecendo na grande imensidão do oceano. Esta história serviu de exemplo a mim, na construção desta dissertação, através da ajuda de cada um que se envolveu de alguma forma para a realização deste trabalho, no qual eu só tenho a agradecer!

- Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado caminhos e oportunidades na minha vida para chegar até aqui e com muita fé concluir mais uma etapa;
 - A toda minha família pelo carinho e apoio em que sempre me foram dados. Em especial agradeço aos meus pais e irmãos de coração, Fanfa e Vera; Fabio e Ana Cristina, pelo amor, fé, força, união e compreensão, no qual sempre se fizeram presentes em todos os momentos;
 - À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização deste trabalho;
 - À professora Cristiane de Bona da Silva por ter confiado no meu trabalho e no meu potencial, pela transmissão de seus conhecimentos, além de ter servido como base sólida para a construção deste trabalho e a professora Scheila Schaffazick, pelas ideias, conversas, ensinamentos e atenção que sempre foram prestados;
 - À Mariana, no qual tive a maior sorte e orgulho de ser minha IC, pela amizade, companheirismo, paciência, ajuda constante e dedicação total, no qual sempre se mostrou prestativa a enfrentar qualquer desafio;
 - À Fê, Juh, Ana, Andréia, Ju Lima, Pri, Lara, Jana e Sara, amigas que cativei e levarei sempre junto comigo, divertidas, companheiras, atenciosas, no qual tive a oportunidade de trocar conhecimentos, saber ouvir e ser ouvida. Também agradeço a Rose e as demais meninas da Farmacotec (Ju Barros, Dai, Tami e Andréia M.), que sempre foram atenciosas, queridas, parceiras e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;
 - Ao meu primo Henrique pelos dois anos de convivência morando juntos, pelo companheirismo e paciência. Agradeço a minha amiga Isadora, pelas conversas, apoio e moradia nos últimos meses em que estive em Santa Maria;
 - 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. À Profa. Dra. Leticia Cruz pela disponibilidade de materiais para realização dos ensaios de liberação. Ao Márcio Santana, através do Laboratório Farmacêutico Elofar, pelas análises em karl fischer;
 - Ao CNPq pela bolsa de estudos e apoio financeiro;
 - E por fim, agradeço aos demais amigos pelo apoio, e aos funcionários da UFSM que sempre foram atenciosos e prestativos, contribuindo para a realização deste trabalho;
- “Graças a todos vocês, as geleiras também foram rompidas...”***

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS SECOS REDISPERSÍVEIS A PARTIR DE NANOESTRUTURAS CONTENDO TIOCONAZOL

AUTORA: ROSEANE FAGUNDES RIBEIRO

ORIENTADORA: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

CO-ORIENTADORA: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de abril de 2013.

A secagem por aspersão (*spray-drying*) e a liofilização são técnicas de desidratação que servem como alternativa para aumentar a estabilidade de formulações que se encontram em meio aquoso. Neste sentido, este trabalho objetivou o desenvolvimento de produtos secos redispersíveis preparados a partir de suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões utilizando o tioconazol, um fármaco antifúngico. As suspensões de nanocápsulas, preparadas com os polímeros poli(ϵ -caprolactona) – PCL e Eudragit[®] RS100, e nanoemulsões contendo tioconazol (1,0 mg/mL) foram avaliadas quanto ao diâmetro médio de partículas, teor de fármaco, pH e eficiência de encapsulamento, as quais, após a preparação, apresentaram características físico-químicas adequadas: diâmetro médio de partículas na faixa nanométrica (110 – 210 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,20, teor de fármaco próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100 % e 86 % para as nanocápsulas de PCL e Eudragit[®] RS100, respectivamente. Além disso, as formulações foram estáveis por 30 dias. Após, as formulações líquidas foram submetidas à secagem por aspersão e/ou a liofilização, utilizando a lactose e a trealose como adjuvantes, na proporção de 10 % (m/v). Os produtos secos foram caracterizados em relação ao rendimento, índice de ressuspensão em água, teor de fármaco, umidade e morfologia. Independente do método de desidratação e do adjuvante, os produtos secos apresentaram características físico-químicas satisfatórias: rendimento de 50 – 100 % (dependendo da técnica de desidratação), teor de fármaco próximo ao teórico, percentual de umidade inferior a 4,2 %, boa redispersão em água, sendo possível verificar a presença de partículas nanométricas e micrométricas (por difração a laser), e a retomada do tamanho nanométrico semelhante à formulação líquida original, após filtração (espectroscopia de correlação de fótons). Na análise morfológica foi observada a presença de partículas arredondadas para os pós obtidos por *spray-drying* e irregulares para os obtidos por liofilização. Os produtos secos foram estáveis por 30 dias; todavia, os pós obtidos a partir de nanoemulsões e nanocápsulas de Eudragit[®] RS100, por *spray-drying* e lactose como adjuvante, apresentaram um decaimento no teor de tioconazol. As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões e seus respectivos produtos secos contendo tioconazol apresentaram atividade antifúngica frente à levedura de *C. albicans*, demonstrando que os processos de desidratação não afetaram a ação do fármaco. A avaliação de liberação *in vitro* do fármaco pela técnica de sacos de diálise demonstrou que os produtos secos preparados a partir de nanocápsulas foram capazes de promover o controle de liberação do fármaco, destacando-se os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas de PCL por *spray-drying* que apresentaram maior controle na liberação do tioconazol no tempo de 48 horas.

Palavras-chave: Lactose. Liofilização. Nanocápsulas. *Spray-drying*. Tioconazol. Trealose.

ABSTRACT

Master Dissertation

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

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF REDISPERSIBLE DRIED PRODUCTS FROM NANOSTRUCTURES CONTAINING TIOCONAZOLE

AUTHOR: ROSEANE FAGUNDES RIBEIRO

ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

CO-ADVISOR: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Place and Date of Defense: Santa Maria, April 29, 2013.

Spray-drying and freeze-drying are dehydration techniques which serve as alternative to increase the stability of formulations which are in aqueous medium. Therefore, this study objectived the development of redispersible dried products prepared from suspensions of polymeric nanocapsules and nanoemulsions using tioconazole, an antifungal. The suspension of nanocapsules, prepared using poli(ϵ -caprolactona) - PCL and Eudragit[®] RS100 polymers, and nanoemulsions containing tioconazole (1.0 mg/ml) were evaluated in relation to mean particles size, drug content, pH and encapsulation efficiency, and after preparation, showed physicochemical characteristics suitable: mean particles size in the nanometer range (110 – 210 nm), polydispersity index below 0.20, drug content near to theoretical and encapsulation efficiency of approximately 100 % and 86 % for the PCL and Eudragit[®] RS100 nanocapsules, respectively. Furthermore, the formulations have been stable for 30 days. After, the liquid formulations were subjected to spray-drying and/or freeze-drying using lactose and trehalose as adjuvants in a proportion of 10 % (w/v). The dried products were characterized in relation to yield, index resuspension in water, drug content, moisture and morphology. Regardless of the method of dehydration and adjuvant, the dried products presented satisfactory physicochemical characteristics: yield 50 – 100 % (depending on the technique of dehydration), drug content near to theoretical, percentage of moisture of less than 4.2 %, good redispersion in water, is possible to verify the presence of nanometric and micrometric particles (by laser diffraction), and the recovery of nanometer size similar to the original liquid formulation, after filtration (photon correlation spectroscopy). Morphological analysis showed the presence of rounded particles for the powders obtained by spray-drying and irregular to those obtained by freeze-drying. Dried products were stable for 30 days, however, the powders obtained from nanoemulsions and nanocapsules of Eudragit[®] RS100, by spray-drying and lactose as adjuvant showed a decrease in tioconazole content. The suspensions of nanocapsules and nanoemulsions and their respective dried products containing tioconazole showed antifungal activity against the yeast *C. albicans*, demonstrating that the dehydration process did not affect the action of the drug. Evaluation of *in vitro* release of the drug by the technique of dialysis bags showed that dried products prepared from nanocapsules were able to promote the control release of the drug, especially the dried products obtained from nanocapsules of PCL by spray-drying, which showed more tioconazole control release at time of 48 hours.

Keywords: Lactose. Freeze-drying. Nanocapsules. Spray-drying. Tioconazole. Trehalose.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Esquema ilustrativo da técnica de secagem por aspersão (<i>spray-drying</i>).....	25
FIGURA 2 - Esquema ilustrativo da técnica de desidratação por liofilização (<i>freeze-drying</i>).....	30
FIGURA 3 - Estrutura química do tioconazol.....	33

CAPÍTULO 1: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: estudo comparativo de secagem por aspersão e liofilização

FIGURA 1 - Distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC _P -TIO e NE-TIO, respectivamente) e as análises por via-úmida nos tempos de 0 e 60 minutos para NC _P -TIO-S (A), NE-TIO-S (B), NC _P -TIO-L (C) e NE-TIO-L (D).....	55
FIGURA 2 - Diâmetro médio das partículas de suspensões de nanocapsulas contendo tioconazol (NC _P -TIO) e os respectivos produtos secos após redispersão em água (NC _P -TIO-S e NC _P -TIO-L); nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO) e os respectivos produtos secos (NE-TIO-S e NE-TIO-L). Sf/Si= índices de ressuspensão dos produtos secos relativos à formulação de origem; * Diferença significativa em relação à suspensão original.....	56
FIGURA 3 - Distribuição do tamanho médio das partículas por espectroscopia de correlação de fótons das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC _P -TIO e NE-TIO) e as respectivas redispersões dos produtos secos em água da NC _P -TIO-S (A), NE-TIO-S (B), NC _P -TIO-L (C) e NE-TIO-L (D).....	58
FIGURA 4 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos produtos secos. NC _P -TIO-S (A), NE-TIO-S (B), NC _P -TIO-L (C), NE-TIO-L (D), L-S (E), L-L (F). [A, B,C, E e F (5,000x); D (1,500x)].....	60
FIGURA 5 - Avaliação do tamanho de partículas (A), índice de polidispersão (B) e teor de fármaco (C) das suspensões de nanocápsulas (NC _P -TIO e NC _P -B) e nanoemulsões (NE-TIO e NE-B) após preparação e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.....	62

FIGURA 6 - Avaliação do tamanho de partículas (A) e teor de fármaco (B) dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC _P -TIO-S, NC _P -B-S, NC _P -TIO-L e NC _P -B-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S, NE-B-S, NE-TIO-L, NE-B-L) após preparação e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.....	64
FIGURA 7 - Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) determinados na avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC _P -TIO e NE-TIO, respectivamente); dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC _P -TIO-S e NC _P -TIO-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S e NE-TIO-L) contendo tioconazol e solução de tioconazol (S-TIO) (n = 6).....	65
FIGURA 8 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> do tioconazol a partir dos produtos secos (NC _P -TIO-S, NC _P -TIO-L), após redispersão em água, e solução do fármaco (S-TIO).....	67

CAPÍTULO 2: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão: estudo comparativo entre adjuvantes de secagem

FIGURA 1 - Distribuição de tamanho de partícula por difração a laser da suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol (NC _E -TIO) e dos produtos secos, analisados por via-úmida, nos tempos 0 (após redispersão) e 60 minutos. (A) NC _E -TIO-S _{LAC} e (B) NC _E -TIO-S _{TREA}	94
FIGURA 2 - Distribuição de tamanho de partículas por espectroscopia de correlação de fótons, da suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol (NC _E -TIO) e dos produtos secos após redispersão em água (A) NC _E -TIO-S _{LAC} e (B) NC _E -TIO-S _{TREA}	96
FIGURA 3 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos produtos secos. NC _E -TIO-S _{LAC} (A) e (C); NC _E -TIO-S _{TREA} (B) e (D); S _{LAC} (E) e S _{TREA} (F). [A e B (1,500x); C, D, E e F (5,000x)].....	98
FIGURA 4 - Valores de tamanho médio de partículas (A), índice de polidispersão (B) e teor de tioconazol (C) determinados no estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas (NC _E -TIO e NC _E -B).....	100
FIGURA 5 - Valores de tamanho médio de partículas (A) e teor de tioconazol (B) determinados no estudo de estabilidade dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas utilizando como adjuvantes de secagem a lactose (NC _E -TIO-S _{LAC} e NC _E -B-S _{LAC}) ou a trealose (NC _E -TIO-S _{TREA} e NC _E -B-S _{TREA}).....	102

FIGURA 6 - Avaliação da atividade antifúngica do tioconazol frente à levedura de <i>C. albicans</i> , associado às nanocápsulas poliméricas (NC _E -TIO), produtos secos obtidos a partir das nanocápsulas (NC _E -TIO-S _{LAC} e NC _E -TIO-S _{TREA}) e solução do fármaco livre (S-TIO).....	104
FIGURA 7 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> do tioconazol a partir dos produtos secos contendo nanocápsulas (NC _E -TIO-S _{LAC} e NC _E -TIO-S _{TREA}) e da solução metanólica (S-TIO).....	106

DISCUSSÃO GERAL

FIGURA 1 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> dos produtos secos contendo tioconazol por <i>spray-drying</i> (NC _P -TIO-S e NC _E -TIO-S _{LAC}) e da solução metanólica (S-TIO).....	123
--	-----

APÊNDICES

FIGURA 1 - Cromatogramas obtidos por CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC _P -TIO-S (20,0 µg/mL); (C) NC _P -B-S.....	142
FIGURA 2 - Cromatogramas obtidos por análise em CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC _E -TIO-S _{LAC} (20,0 µg/mL) e (C) NC _E -B-S _{LAC}	143
FIGURA 3 - Cromatogramas obtidos por análise em CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC _E -TIO-S _{TREA} (20,0 µg/mL) e (C) NC _E -B-S _{TREA}	143

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: estudo comparativo de secagem por aspersão e liofilização

TABELA 1 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC _P -TIO) e nanoemulsões (NE-TIO) contendo tioconazol (1,0 mg/mL) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC _P -B e NE-B), (n = 3, média ± s).....	51
TABELA 2 - Caracterização físico-química dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC _P -TIO-S) e nanoemulsões (NE-TIO-S) contendo tioconazol por <i>spray-drying</i> e por liofilização (NC _P -TIO-L e NE-TIO-L) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC _P -B-S, NE-B-S, NC _P -B-L e NE-B-L) (n = 3, média ± s)...	53
TABELA 3 - Parâmetros de liberação calculados a partir da modelagem matemática para os produtos secos contendo nanocápsulas (NC _P -TIO-S e NC _P -TIO-L).....	69

CAPÍTULO 2: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit® RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão: estudo comparativo entre adjuvantes de secagem

TABELA 1 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1 mg/mL) (NC _E -TIO) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC _E -B), (n = 3, média ± s).....	90
TABELA 2 - Caracterização físico-química dos produtos secos obtidos, por <i>spray-drying</i> , a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e como adjuvantes de secagem a lactose (NC _E -TIO-S _{LAC}) ou a trealose (NC _E -TIO-S _{TREA}), além das amostras sem fármaco (NC _E -B-S _{LAC} e NC _E -B-S _{TREA}), (n = 3, média ± s).....	92
TABELA 3 - Constantes de velocidade (k1 e k2), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos na modelagem matemática dos perfis de liberação do tioconazol a partir dos produtos secos (NC _E -TIO-S _{LAC} e NC _E -TIO-S _{TREA}).....	107

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo geral	18
1.2 Objetivos específicos	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos	20
1.2 Técnicas de desidratação/preparação de formas farmacêuticas sólidas contendo sistemas nanoparticulados	24
1.2.1 Secagem por aspersão (<i>spray-drying</i>).....	24
1.2.2 Liofilização (<i>freeze-drying</i>).....	28
1.3 Tioconazol	33
CAPÍTULO 1: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: estudo comparativo de secagem por aspersão e liofilização	38
1.1 Apresentação	38
CAPÍTULO 2: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit® RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão: estudo comparativo entre adjuvantes de secagem	79
2.1 Apresentação	79
DISCUSSÃO GERAL	116
CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
APÊNDICES	142

INTRODUÇÃO

As dermatofitoses ou micoses superficiais são infecções cutâneas produzidas por fungos queratinofílicos denominados dermatófitos, que compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, além de algumas leveduras como *Candida* sp. Estes agentes são capazes de invadir os tecidos queratinizados (pele, pêlos e unhas) dos homens e animais, produzindo infecções e inflamações decorrentes do processo de destruição da queratina (RUBIO et al., 1999, DE DIEGO, 2011). As onicomicoses (infecções que acometem as unhas) são as que apresentam maior dificuldade de tratamento terapêutico, necessitando, na maioria dos casos, da administração oral de fármacos antifúngicos por longos períodos de tempo, seguidos de efeitos adversos responsáveis frequentemente pela interrupção do tratamento (MUÑOZ et al., 2010; GROVER; KHURANA, 2012). Dentro deste contexto, a terapia tópica poderia ser uma alternativa promissora, pois visa ao tratamento no local da infecção, eliminando efeitos adversos sistêmicos e interações medicamentosas.

Dentre os fármacos disponíveis para o tratamento destas infecções, os derivados azólicos (imidazólicos e triazólicos) são amplamente empregados (GUPTA; COOPER, 2008), constituídos por um grupo de compostos sintéticos com estruturas químicas semelhantes e amplo espectro de atividade antifúngica (SINDRIM; ROCHA, 2004).

O tioconazol é um derivado imidazólico que apresenta amplo espectro de atividade antifúngica, sendo indicado no tratamento tópico de infecções fúngicas da pele e unhas (FROMTLING, 1988; WELSH; CABRERA; WELSH, 2010), além de candidíase vaginal (NYIRJESY, 2008). É administrado na forma de creme, loção, spray ou pó dermatológico (1 %), sendo também utilizado em solução tópica a 28 %, nos casos de onicomicoses. No Brasil, como medicamento de referência, é comercializado com o nome de Tralen[®] (Pfizer). No tratamento de vulvovaginites, é utilizado em creme ou pomada, na concentração de 6,5 %, e em óvulos (300 mg), com o nome comercial de Gino-Tralen[®] (Pfizer) (SWEETMAN, 2006).

A necessidade do uso de altas concentrações do tioconazol para obtenção do efeito terapêutico desejado, principalmente nos casos de onicomicoses e vulvovaginites, pode ser o principal problema relacionado com o aparecimento de algumas reações adversas, como coceira, irritação local, alergias, eritema, prurido, dor durante o ato sexual e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006). Além disso, outro problema enfrentado na terapêutica é a

reduzida absorção cutânea (MUÑOZ et al., 2010) e vaginal (ARTNER; FUCHS, 1983), visto que a eficácia do fármaco depende, também, da sua biodisponibilidade no local de ação.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados a respeito de diferentes tipos de carreadores de fármacos, como os sistemas nanoestruturados. Neste sentido, nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões apresentam atual interesse na área farmacêutica e diferentes moléculas têm sido associadas a fim de contornar certos obstáculos que fármacos e/ou formulações convencionais apresentam. Em virtude do tamanho reduzido ($< 1 \mu\text{m}$), tais sistemas podem conferir muitas vantagens, como o direcionamento da substância ativa associada ao sítio específico de ação, aumentando o efeito terapêutico e/ou reduzindo os efeitos adversos (COUVREUR et al., 2002; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006), além da possibilidade de promoverem o controle da liberação da mesma no local de ação (MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). As nanoestruturas podem, adicionalmente, conferir aumento da estabilidade química dos fármacos a elas associados (SCHAFFAZICK, et al., 2003a; OURIQUE et al., 2008). No entanto, estes sistemas apresentam uma limitada estabilidade em meio aquoso, uma vez que, durante o armazenamento, podem ocorrer mudanças nas suas propriedades físico-químicas, como precipitação/degradação de componentes e perda da substância ativa encapsulada (MAGENHEIM; BENITA, 1991, BECK et al., 2012). Em função disto, técnicas que levem à desidratação das suspensões nanoparticuladas têm sido estudadas e desenvolvidas a fim de contornar estas limitações, tais como a secagem por aspersão (MÜLLER et al., 2000) e a liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003b).

Tendo em vista as dificuldades encontradas para a administração tópica do tioconazol, novos sistemas de liberação contendo este fármaco, como os nanocarreadores, poderiam ser desenvolvidos, objetivando o aumento da eficácia terapêutica do fármaco, com conseqüente diminuição da dose necessária e, portanto, a redução dos efeitos adversos causados pelo mesmo. Além disso, a literatura a respeito do desenvolvimento de formulações contendo tioconazol, bem como sua caracterização e avaliação biológica é escassa.

Cabe salientar que não foram encontrados dados na literatura a respeito da associação deste fármaco a nanocarreadores. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa se encontram em andamento, visando ao desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol e, dentre os sistemas desenvolvidos, alguns foram objetos de estudo neste trabalho.

Face ao exposto, este trabalho objetivou o desenvolvimento de produtos secos redispersíveis a partir da secagem por aspersão ou liofilização de suspensões de nanocápsulas

poliméricas e nanoemulsão contendo tioconazol, visando à comparação das características físico-químicas dos mesmos, além da avaliação da capacidade destes sistemas quanto à eficácia antifúngica e ao controle de liberação do fármaco.

Objetivando uma melhor apresentação e compreensão dos resultados, o presente trabalho foi dividido em duas partes experimentais: os estudos relativos à obtenção de produtos secos a partir da associação do tioconazol à nanocápsulas e nanoemulsões pelos métodos de desidratação por *spray drying* e liofilização serão apresentados no capítulo 1; o capítulo 2 se refere à secagem por aspensão de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo o fármaco em estudo e o emprego de lactose e trealose como adjuvantes de secagem.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolver produtos secos a partir de suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol, através de duas técnicas de desidratação, a secagem por aspersão e a liofilização, visando à obtenção de uma forma farmacêutica sólida intermediária ou final para o tratamento tópico de micoses superficiais.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, empregando poli(ϵ -caprolactona) ou Eudragit[®] RS100;
- Preparar nanoemulsões contendo tioconazol, para fins comparativos;
- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho, pH, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento;
- Obter produtos secos a partir de suspensões de nanocápsulas poliméricas ou nanoemulsões contendo tioconazol, empregando as técnicas de secagem por aspersão e/ou a liofilização, além de carboidratos como adjuvantes (lactose ou trealose);
- Caracterizar os produtos secos mediante o rendimento, o índice de ressuspensão em água, teor de fármaco, umidade e morfologia;
- Estudar a estabilidade físico-química do fármaco associado às suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões e dos seus respectivos produtos secos, à temperatura ambiente, no período de 30 dias;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do tioconazol associado às suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões e dos seus respectivos produtos secos, frente à levedura de *Candida albicans*, pelo método de difusão em ágar;
- Comparar os perfis de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos desenvolvidos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos

A nanotecnologia é uma área da ciência que fornece ferramentas para trabalhar em níveis atômicos, moleculares e supramoleculares, e conduzem a criação de dispositivos e sistemas de liberação com funções e propriedades inovadoras (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). No âmbito farmacêutico, a nanotecnologia é representada pelos nanocarreadores que em suas variadas formas têm a possibilidade de fornecer características diferenciadas, podendo modular a velocidade e o local de liberação do fármaco (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010), possibilitando uma liberação controlada do ativo, com o objetivo de promover adequada eficácia e seletividade às formulações, além de diminuir os efeitos tóxicos causados por determinadas substâncias (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Os sistemas nanoestruturados possuem a característica de direcionar os fármacos a um local específico no organismo, gerando um aumento da sua concentração no local de ação e redução dos seus efeitos adversos. Além disso, pelo reduzido tamanho de partículas ($< 1 \mu\text{m}$), estes sistemas são capazes de superar a resistência oferecida pelas barreiras fisiológicas do organismo (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). Cabe salientar que o fármaco associado ao nanocarreador não sofre modificação no seu mecanismo de ação; entretanto, estas estruturas são capazes de “mascarar” as características físico-químicas das substâncias associadas, como solubilidade, viabilizando a veiculação de substâncias pouco solúveis, passando a ser distribuídas no organismo conforme as características do carreador, possibilitando, também, o controle da liberação do princípio ativo no local de ação (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010) e o aumento da estabilidade de substâncias frente à luz, oxidação e hidrólise, reduzindo a sua susceptibilidade à degradação (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2010).

Na área farmacêutica, os principais nanocarreadores estudados são os lipossomas, as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões e as nanopartículas lipídicas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas, constituídas por uma ou mais bicamada (s) concêntrica (s) de fosfolipídeos, que se organizam em um meio aquoso, sendo, portanto, sistemas de caráter anfifílico, capazes de encapsular fármacos hidrofílicos e

lipofílicos (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). As nanopartículas lipídicas podem ser divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). São formadas por substâncias graxas de caráter lipídico e/ou oleoso (PARDEIKE et al., 2009).

As nanopartículas poliméricas são definidas como partículas sólidas coloidais, classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si na estrutura e composição (VAUTHIER e BOUCHEMAL; 2009). As nanocápsulas são estruturas vesiculares, constituídas por um núcleo de natureza geralmente oleosa, envolto por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, enquanto que as nanoesferas são estruturas matriciais poliméricas que não apresentam óleo em sua composição, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010).

Um tipo particular de nanocápsulas, denominadas de núcleo lipídico, são constituídas por uma parede polimérica que envolve o núcleo lipofílico constituído por triglicerídeos de cadeia média e monoestearato de sorbitano, estabilizadas por polissorbato 80 (tensoativo de alto EHL). Estes sistemas, por conter uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano) no núcleo hidrofóbico, apresentam núcleo mais viscoso do que as nanocápsulas convencionais (JAGER et al., 2009), sendo pesquisadas para a veiculação de fármacos hidrofóbicos voltados a diversas aplicações terapêuticas (BERNARDI et al., 2009; OURIQUE et al., 2010; VENTURINI et al., 2011; JORNADA et al., 2012).

As nanoemulsões correspondem a um sistema constituído por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos, dispersas na fase aquosa (BOUCHEMAL et al., 2004).

Dentre os variados métodos de preparação das nanocápsulas poliméricas, um dos mais empregados e escolhido para o desenvolvimento deste trabalho é o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, desenvolvido por Fessi e colaboradores (1988). Este consiste na obtenção de nanocápsulas na forma de suspensão coloidal aquosa, no qual uma fase orgânica constituída de um solvente miscível em água, um tensoativo de baixo EHL, um óleo, o fármaco e o polímero é vertida sobre uma fase aquosa constituída por um tensoativo de alto EHL. Neste momento, o solvente orgânico se difunde em um meio não solvente para o polímero (água), e na interface óleo/água o polímero precipita ao redor das gotículas de óleo. Esta técnica de preparação tem como vantagem altas taxas de associação de fármacos e boa reprodutibilidade (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Os polímeros mais utilizados para o desenvolvimento das nanocápsulas são os poliésteres biodegradáveis, especialmente a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico)

(PLA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). 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). Outros polímeros que podem ser utilizados são os polimetacrilatos, especialmente o Eudragit[®] L100, Eudragit[®] S100, Eudragit[®] RL100 e Eudragit[®] RS100, os quais diferem quanto à descrição, solubilidade e aplicação. O Eudragit[®] RL100 e Eudragit[®] RS100 são copolímeros de metacrilato de amônio que diferem na quantidade de grupos quaternários; são catiônicos, pH independentes e utilizados para promover liberação sustentada (NIKAM et al., 2011). Este último, em especial, é um copolímero de metacrilato de amônio (contém 4,5 - 6,8 % de grupos quaternários de amônio) e, pela afinidade com o fármaco, pode maximizar a absorção celular do complexo fármaco-polímero (PERUMAL et al., 1999), além de ser promissor no controle da liberação do fármaco em alguns fluidos fisiológicos (PIGNATELLO et al., 2002; BARZEGAR-JALALI et al., 2012).

Durante o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas, as características físico-químicas e a estabilidade destes sistemas devem ser monitoradas, destacando-se: avaliação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, pH, análise morfológica, teor e taxa de associação do fármaco, utilizando técnicas específicas como espectroscopia de correção de fótons, ultrafiltração-centrifugação, potenciometria, microscopia eletrônica (transmissão ou varredura, associada ou não à criofratura), dispersão de raios X, calorimetria exploratória diferencial, entre outras (SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Variadas são as vias destinadas à administração das nanopartículas e os estudos estão sendo direcionados, especialmente, para as vias parenteral, oral, oftálmica (SCHAFFAZICK et al., 2003a) e tópica (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; ZHAO; BROWN; JONES, 2010). Como exemplos, na administração parenteral a associação de fármacos antitumorais, como a tretinoína à nanocápsulas de núcleo lipídico foi promissora na distribuição mais seletiva do fármaco e, com isso, no aumento do índice terapêutico (OURIQUE et al., 2010). Para a via oral, a utilização destes sistemas está relacionada à proteção do fármaco frente à ação de enzimas digestivas e à diminuição de efeitos adversos, como irritação gástrica (BECK et al., 2006), além do aumento da biodisponibilidade (SONAJE et al., 2010). Na aplicação tópica, a associação de fármacos às nanoestruturas objetiva, especialmente, diminuir a irritação local, evitar a absorção sistêmica de substâncias através da pele (SHAH et al., 2007), além de promover uma liberação prolongada/sustentada

(MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2009; FONTANA et al., 2010). Adicionalmente, a proteção da volatilidade de óleos essenciais (FLORES et al., 2011) e o aumento da eficácia em modelo de onicomicose tem sido demonstrada a partir de nanocápsulas poliméricas (FLORES et al., 2013).

A inclusão de nanocarreadores em formulações de uso tópico tem despertado o interesse de muitos pesquisadores e novas formulações estão sendo desenvolvidas visando a uma aplicação farmacêutica ou cosmética. O tecido cutâneo é formado por três camadas distintas (epiderme, derme e hipoderme), no qual o estrato córneo (camada mais externa da epiderme) é composto por junções intercelulares onde há um cruzamento de corneócitos lipídicos e desmossomos (estruturas especializadas de adesão entre as células). A qualidade, a cristalinidade e a quantidade de lipídios no estrato córneo determinam as características da barreira cutânea (CEVC, 2004), sendo esta o principal obstáculo para a penetração de substâncias administradas sobre a pele (LADEMANN et al., 2011). Neste caso, as nanopartículas poliméricas podem, também, apresentar vantagens, uma vez que estes sistemas são capazes de modular a absorção transdérmica de fármacos, modificando a atividade da molécula e/ou sua partição e difusão, podendo alterar sua farmacocinética e biodistribuição através da pele (ALVES et al., 2007; MARCHIORI et al., 2010). Além disso, por possuírem um tamanho reduzido, estes nanocarreadores facilitam o uso em produtos dermatológicos, permitindo uma aplicação mais confortável à pele (CEVC, 2004; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007), além de possibilitar um aumento no tempo de permanência (adesividade) dos produtos após aplicação, tratando-se de locais em constante fricção por vestimentas ou pelas simples atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; WEISS-ANGELI et al., 2008). Adicionalmente, os nanocarreadores podem promover uma liberação mais homogênea do fármaco em virtude da grande área superficial que apresentam (BOUCHEMAL et al., 2004; LADEMANN et al., 2007).

No entanto, após a preparação, as nanopartículas poliméricas se encontram sob a forma de suspensão coloidal aquosa e, quando armazenadas neste meio, podem apresentar problemas de estabilidade, como mudanças nas propriedades físico-químicas; hidrólise do polímero, levando à perda da substância ativa encapsulada; tendência à agregação das partículas; sedimentação e contaminação microbiana (MAGENHEIM; BENITA, 1991; SCHAFFAZICK et al., 2003a; BECK et al., 2012). Desta forma, os processos de desidratação de sistemas aquosos se apresentam como uma alternativa, pela possibilidade de contornar os obstáculos farmacotécnicos e os relacionados à estabilidade, visando, também, a uma melhor

aplicabilidade industrial (ABDELWAHED et al., 2006a; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012)

1.2 Técnicas de desidratação/preparação de formas farmacêuticas sólidas contendo sistemas nanoparticulados

Conforme apresentado anteriormente, a estabilidade das nanopartículas em meio aquoso é limitada e a conversão destas em materiais desidratados tem possibilitado contornar este obstáculo. Além disso, os produtos secos obtidos por processos de secagem podem ser convertidos em variadas formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, preparações semissólidas, entre outras (BECK et al., 2012). Dentre os métodos empregados para este fim, podem ser citados a secagem por aspersão (MULLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2006; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2006; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012) e a liofilização (AUVILLAIN et al., 1989; DE CHASTEIGNER et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003b, ABDELWAHED et al., 2006a; ABDELWAHED et al., 2006b).

Outra forma de obtenção de produtos sólidos, através da granulação por via úmida, foi recentemente descrita (FRIEDRICH et al., 2010). Citando brevemente, a granulação por via úmida trata-se de um método no qual a suspensão de nanoestruturas pode substituir o líquido responsável pela aglomeração das partículas sólidas, e a massa úmida formada passa por um tamis, originando grânulos que serão, em seguida, secos. Friedrich e colaboradores (2010) prepararam produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas contendo dexametasona, as quais foram utilizadas como líquido de granulação. A análise morfológica dos grânulos resultantes evidenciou a presença das nanoestruturas na superfície dos mesmos; o teor de fármaco obtido foi de 94 % e os grânulos foram estáveis por seis meses à temperatura ambiente.

1.2.1 Secagem por aspersão (*spray-drying*)

A secagem por aspersão ou *spray-drying* (Figura 1) é uma técnica usualmente empregada para a secagem de suspensões de nanopartículas. Além disso, este método é amplamente empregado na área farmacêutica e apresenta como vantagens a rapidez na preparação, maior facilidade de transposição de escala e a possibilidade de aplicação para substâncias termossensíveis (RÉ, 2006; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Adicionalmente, é um processo rápido e de baixo custo, no qual são obtidos produtos secos com baixos teores de umidade e, conseqüentemente, com um longo período de vida útil em prateleira (SHABDE; HOO, 2006; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; GHARSALLAOUI et al., 2007; BECK, et al., 2012).

O processo é inicializado pela atomização de uma amostra líquida, previamente misturada a um ou mais adjuvantes, em uma torre de secagem, no qual ocorre a formação de gotículas finas, que em seguida passam por uma câmara de secagem e em contato com uma corrente de ar quente, resultam na formação de partículas sólidas. Desta forma, quatro etapas fundamentais estão envolvidas: aspersão da amostra, contato líquido-vapor aquecido, evaporação e separação sólido-gás/vapor (BECK 2005; SHABDE; HOO, 2006; GHARSALLAOUI et al., 2007; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007).

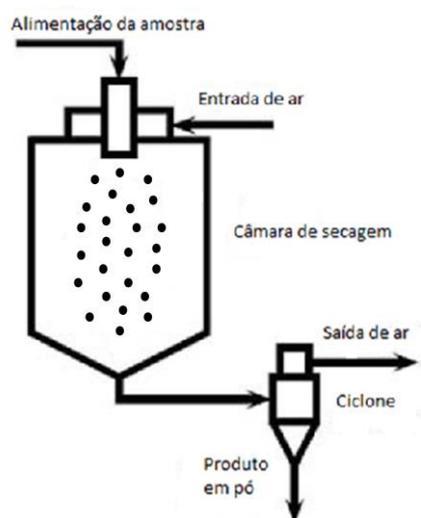


Figura 1- Esquema ilustrativo da técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*) (CHEC Research Centre, 2007).

Segundo Tewa-Tagne e colaboradores (2006), o conhecimento da natureza dos constituintes, das concentrações utilizadas, das propriedades de secagem e dos adjuvantes empregados na preparação das micropartículas é necessário para a formação de um pó com características adequadas. O uso de adjuvantes de secagem (materiais poliméricos, carboidratos ou dióxido de silício coloidal) é importante, pois estes minimizam a adesão das partículas nas paredes do equipamento (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007). Dentre as substâncias, os carboidratos são muito utilizados por apresentarem elevada solubilidade em água com características favoráveis para a obtenção de produtos secos redispersíveis, além de apresentarem um bom perfil de segurança para a integridade das partículas (TOMODA et al., 2008).

Müller e colaboradores (2000) empregaram pela primeira vez a técnica de *spray-drying* para a secagem de nanocápsulas poliméricas contendo diclofenaco, utilizando como adjuvante de secagem o dióxido de silício coloidal 3 % (m/v). Após a secagem, a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou a presença das nanoestruturas adsorvidas às micropartículas esféricas, com valores semelhantes de tamanho médio de partículas (200 nm) das suspensões antes do processo de desidratação, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons. O controle morfológico do revestimento das micropartículas/pó possui um comportamento diferenciado em relação a sistemas com diferentes formas de preparação, como as nanoesferas e as nanocápsulas (POHLMANN et al., 2002; RAFIN et al., 2003).

Em relação aos efeitos biológicos, após a administração oral em ratos, pós secos obtidos por nanocápsulas contendo diclofenaco (anti-inflamatório não esteroide) foram dispersos em água onde houve a redução do efeito irritante gastrointestinal do fármaco. Além disso, um estudo farmacocinético em ratos também foi conduzido, mostrando uma completa absorção oral do fármaco a partir dos pós dispersos em água (GUTERRES et al., 2001).

Obach (2002) avaliou a potencialidade dos pós obtidos a partir de nanocápsulas, nanoesferas e nanodispersão em modificar a liberação da indometacina e diferenças entre os perfis de dissolução do fármaco foram observadas. Os produtos secos por *spray-drying* contendo as nanocápsulas, após redispersão em água, apresentaram tamanho médio de 200 nm e exibiram importante proteção quanto à ação ulcerativa da indometacina no trato gastrintestinal, após administração oral em ratos.

Beck e colaboradores (2004) empregaram métodos com uma ou duas etapas para a obtenção de micropartículas nanorrevestidas de diclofenaco utilizando o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. No método com uma etapa, o adjuvante e o fármaco foram previamente dispersos na suspensão coloidal (nanocápsulas ou nanoesferas) e, após, esta mistura foi submetida à secagem por aspersão. No método com duas etapas, o adjuvante e o fármaco foram primeiramente dispersos em acetona e posteriormente submetidos à evaporação sob pressão reduzida para obtenção de um núcleo sólido, que, após, foi adicionado à suspensão de nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) antes da secagem por aspersão. O diclofenaco ácido livre e o diclofenaco de sódio foram empregados neste trabalho como modelo de fármacos lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Todos os produtos secos apresentaram nanopartículas aderidas a sua superfície. Estudos posteriores, também, demonstraram o emprego da secagem por aspersão na obtenção de micropartículas revestidas por nanopartículas poliméricas (BECK et al., 2006; BECK et al., 2007).

Schaffazick e colaboradores (2006) desenvolveram produtos secos a partir de nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] S100 contendo melatonina, utilizando o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, com o propósito de promover o aumento da estabilidade e liberação sustentada. Através da microscopia eletrônica de varredura foi detectada a presença de nanopartículas na superfície dos pós secos e obteve-se um perfil de liberação controlado (monoexponencial) em comparação ao fármaco livre, pela técnica de células de fluxo. Além disso, os pós secos por aspersão apresentaram estabilidade por um período de 12 meses, enquanto que as suspensões de nanocápsulas após três meses e meio já apresentavam precipitados.

Tewa-Tagne e colaboradores (2007) desenvolveram produtos secos por *spray-drying* a partir de nanocápsulas de PCL utilizando a lactose 10 % (m/v) como adjuvante de secagem, no qual após a redispersão dos pós em água, pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, foram observados tamanhos médios de partículas semelhantes ao das suspensões de origem. Os autores citaram que a lactose, por ser um carboidrato solúvel em água, apresentou um adequado perfil de redispersão neste meio. Outros trabalhos também utilizaram a lactose a 10 % (m/v) como adjuvante de secagem para a obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012), nos quais resultados satisfatórios foram obtidos no que se refere à redispersão de tais produtos. Ainda, Hoffmeister e colaboradores (2012) observaram que os produtos secos contendo melatonina apresentaram maior controle na liberação do fármaco em relação às suspensões originais, utilizando a técnica de difusão em sacos de diálise.

Domingues e colaboradores (2008) obtiveram micropartículas nanorrevestidas com PCL ou Eudragit[®] RS100 preparadas em etapa única, utilizando a indometacina como fármaco modelo e o dióxido de silício coloidal como adjuvante. Partículas esféricas que apresentaram nanoestruturas adsorvidas a sua superfície foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Em relação à liberação *in vitro* do fármaco, pela técnica de células de fluxo, foi demonstrada a influência do polímero sobre as características de liberação da indometacina a partir dos produtos secos (modelo monoexponencial). A presença das nanopartículas ocasionou um aumento no tempo de meia-vida de liberação da indometacina quando comparada com a solução do fármaco livre.

Jensen e colaboradores (2010) desenvolveram produtos secos a partir de nanopartículas de PLGA contendo siRNA destinados à via pulmonar, onde foram utilizados diferentes adjuvantes de secagem (trealose, lactose e manitol). Os autores obtiveram semelhantes tamanhos de partículas dos pós em relação às nanopartículas originais. Além

disso, a atividade biológica e a integridade do siRNA foram preservadas durante o processo de secagem.

Ógáin e colaboradores (2011) obtiveram micropartículas nanoporosas (NPMPs) de lisozima utilizando a trealose e a rafinose como adjuvantes de secagem. A adição destes adjuvantes ocorreu tendo em vista as suas elevadas temperaturas de transição vítrea, boa estabilidade à temperatura ambiente e potencial adequado para atuar como transportadores proteicos e/ou estabilizadores. A incorporação bem sucedida de lisozima nestas NPMPs demonstrou o potencial destes sistemas em atuarem como transportadores de peptídeos ou proteínas, destinados à administração pulmonar.

No que se refere à secagem por aspersão de fármacos antifúngicos, um aumento nas taxas de dissolução foi observado para os produtos secos obtidos a partir de nanossuspensões contendo itraconazol em comparação às suspensões aquosas (MAHESH e POPESKU, 2008). Jafarinejad e colaboradores (2012) obtiveram micropartículas a partir de nanopartículas de quitosana contendo itraconazol pela secagem por aspersão, utilizando a lactose e o manitol como adjuvantes de secagem, com ou sem 10 % de leucina. Estudos *in vitro* indicaram que as nanopartículas secas com manitol e leucina apresentaram adequadas propriedades para a administração por via pulmonar. Em outro estudo, Cerdeira e colaboradores (2013) desenvolveram produtos secos a partir de nanossuspensões de hidroxipropilmetilcelulose contendo miconazol e itraconazol, individualmente, utilizando o manitol e a celulose microcristalina como adjuvantes de secagem, no qual impediram a aglomeração ou agregação das partículas, facilitando a dissolução dos produtos secos. Embora os dois fármacos utilizados neste trabalho tivessem propriedades semelhantes, as pequenas diferenças na solubilidade aquosa, pKa, potencial zeta, hidrofobicidade e interação com os estabilizadores afetaram a estabilidade dos produtos secos e a dissolução de ambos os compostos.

1.2.2 Liofilização (*freeze-drying*)

A liofilização, também conhecida como *freeze-drying* (Figura 2), é uma operação industrial que consiste na remoção da água de uma amostra congelada por sublimação e dessorção sob vácuo. Esta técnica é bastante utilizada para a desidratação de nanopartículas, no entanto, este processo pode gerar várias tensões durante o congelamento e a desidratação. Assim, crioprotetores são geralmente adicionados à formulação para proteger as nanopartículas das condições que podem gerar estas tensões, no qual servem, também, para aumentar a estabilidade das formulações durante o armazenamento (CHACON et al., 1999;

ABDELWAHED et al., 2006a, KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). É muito importante determinar uma quantidade ideal de crioprotetor, pois, em alguns casos, a presença em excesso ou em baixas concentrações, pode levar ao comprometimento das nanopartículas e promover sua desestabilização (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). Normalmente, um estudo de congelamento-descongelamento deve ser realizado antes da liofilização para selecionar o melhor crioprotetor que é capaz de conservar as propriedades das nanopartículas (ABDELWAHED et al., 2006a).

Os crioprotetores mais comumente utilizados são os carboidratos, sendo os mono e dissacarídeos os mais efetivos quanto à prevalência das características iniciais da formulação, principalmente em relação à manutenção do tamanho de partícula da suspensão original. Por apresentarem uma alta temperatura de transição vítrea, o efeito desses açúcares como crioprotetores é atribuído à formação de uma matriz com características amorfas, que acabam protegendo quanto às tensões mecânicas dos cristais de gelo e promovem um espaçamento, evitando a agregação das partículas durante o congelamento, possibilitando ao produto final a sua fácil redispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003b, ABDELWAHED et al., 2006a; KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). Também, uma distribuição mais homogênea do crioprotetor e das nanopartículas com o fármaco conduzem a pós mais redispersáveis (CHUNG; LEE; LEE, 2012).

O ciclo da liofilização pode ser dividido em três etapas: congelamento (solidificação da amostra), secagem primária (sublimação de gelo) e a secagem secundária (dessorção da água descongelada) (ABDELWAHED et al., 2006a).

O congelamento é a primeira etapa da liofilização, no qual a suspensão líquida fica em repouso e são formados os cristais de gelo da água pura. À medida que o líquido da suspensão torna-se mais concentrado pelo congelamento, a sua viscosidade aumenta. A alta concentração e a solidificação do líquido viscoso produzem a fase amorfa, cristalina ou amorfo-cristalina. Geralmente para que o processo seja concluído com sucesso, a temperatura de congelamento em que a solução é conduzida deve ser abaixo da sua temperatura de transição vítrea (TANG; PIKAL et al., 2004; ABDELWAHED et al. 2006a; ABDELWAHED et al. 2006b). A secagem primária envolve a sublimação do gelo a partir do produto congelado. Nesta etapa, o calor é transferido da prateleira para a solução congelada, onde o gelo sublima. O vapor de água formado passa através da porção seca do produto para a superfície da amostra, no qual é transferido, através da câmara, para o condensador, onde por fim é condensado (ABDELWAHED et al., 2006a). A secagem secundária envolve a remoção da água adsorvida a partir do produto, trata-se da água que não separou como o gelo durante o

congelamento e não sublimou. Uma típica produção em escala com liofilizador é composta de uma câmara de secagem contendo prateleiras com temperatura controlada no qual está conectada a uma câmara de condensação através de uma válvula de grande porte. A câmara de condensação acopla uma série de placas capazes de manter a temperatura muito baixa (inferior a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uma ou mais bombas de vácuo estão ligadas à câmara de condensação para alcançar pressões na faixa de 4 a 40 Pa em todo o sistema durante o funcionamento (PIKAL et al., 1990; ABDELWAHED et al., 2006a).

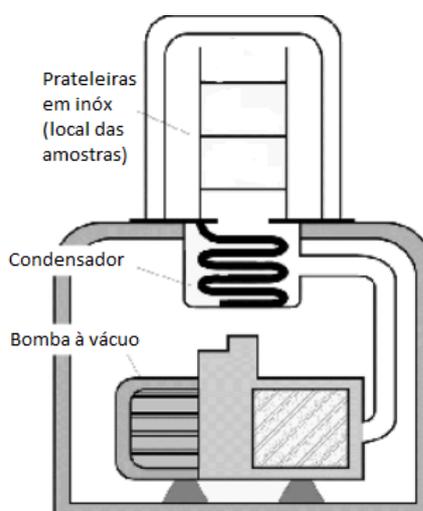


Figura 2- Esquema ilustrativo da técnica de desidratação por liofilização (*freeze-drying*) (MIKOSFERA, Research and Development Ltd, 2007).

Entre os primeiros estudos investigados e relacionados com a desidratação de nanocápsulas poliméricas pode-se citar o realizado por Auvillain e colaboradores (1989) na preparação de produtos secos a partir de nanocápsulas de PCL utilizando como crioprotetor a trealose a 30 % (m/v). Esta concentração foi necessária para preservar a integridade das nanocápsulas durante o processo de congelamento, seguido de desidratação. Além disso, o congelamento de forma rápida e a temperatura de fusão do óleo encapsulado contribuíram para uma boa liofilização.

Choi e colaboradores (2002) utilizaram pluronic F68 como estabilizador sem o uso de crioprotetor para a desidratação de nanocápsulas de PCL, no qual verificaram que o processo de congelamento pode “quebrar” as nanocápsulas, promovendo a saída do conteúdo. Os autores concluíram que esta “quebra” não foi por meio da cristalização da água na fase externa, mas sim pela solidificação do óleo (Miglyol[®] 812) no interior da fase. Os autores sugeriram a aplicação do congelamento de forma lenta e a temperatura do produto mantida acima da temperatura de solidificação do óleo.

Schaffazick e colaboradores (2003b) empregaram dióxido de silício coloidal como adjuvante para a liofilização de suspensões de nanocápsulas de PCL ou Eudragit® S90 contendo diclofenaco. De acordo com os resultados, os pós liofilizados apresentaram teor de fármaco próximo a 100 % e, por microscopia eletrônica de varredura, micropartículas não esféricas foram observadas e, em ampliações maiores, a superfície destas mostrou-se homogeneamente nanorrevestida.

Na busca por investigar o uso de crioprotetores, Abdelwahed e colaboradores (2006b) estudaram a utilização de excipientes amorfos na estabilização de nanocápsulas de PCL submetidas ao processo de liofilização. De acordo com os autores, as nanocápsulas poliméricas possuem uma fina camada de polímero que pode não suportar as tensões deste processo. Os resultados demonstraram que a utilização de excipientes a 5 % (m/v) foi adequada, obtendo-se índices de ressuspensão (recuperação do tamanho de partículas após o processo de desidratação) muito próximos a 1,0. A utilização de sacarose, glicose, polivinilpirrolidona e hidroxipropil- β -ciclodextrina para a obtenção de produtos secos a partir das nanocápsulas possibilitou obter índices de ressuspensão de 0,97; 0,98; 0,96 e 0,95, respectivamente. Estes resultados confirmam a importância do estado amorfo do crioprotetor para assegurar uma boa ação protetora para as nanocápsulas durante o seu processo de congelamento.

Abdelwahed e colaboradores (2006c) verificaram que a utilização do álcool polivinílico na preparação de nanocápsulas de PCL pelo método de emulsificação - difusão foi importante, atuando como estabilizante. Este estabilizador liga-se fortemente à superfície das nanocápsulas e forma uma camada de revestimento estável, podendo estabilizar e melhorar a resistência frente ao congelamento. A adição de crioprotetores, como os açúcares na proporção de 5 % ou 10 % (m/v), é necessária para assegurar a estabilidade das nanocápsulas e uma boa redispersão dos produtos secos (índice de ressuspensão de 0,9 a 1,0). Além disso, a concentração do polímero nas nanocápsulas e a temperatura de solidificação do óleo (Miglyol® 810 ou Miglyol® 829) encapsulado possuem efeito insignificante sobre a estabilidade das nanocápsulas durante o processo de congelamento.

Nanopartículas de PLGA contendo citarabina, preparadas por nanoprecipitação modificada, foram liofilizadas utilizando sacarose a 50 % (m/v) como crioprotetor. Os produtos secos liofilizados apresentaram boa redispersão, com aumento mínimo no tamanho de partículas. A liberação *in vitro* pela técnica de difusão em sacos de diálises demonstrou que o fármaco livre em apenas duas horas liberou por completo, enquanto que os produtos secos por liofilização mantiveram a liberação do fármaco por até 24 horas. Os autores concluíram

que este comportamento pode ser atribuído às propriedades do polímero PLGA em sustentar a liberação do fármaco encapsulado nas nanopartículas (YADAV; SAWANT, 2010).

Nakagawa e colaboradores (2011) desenvolveram produtos secos a partir de nanocápsulas de PCL utilizando uma solução de gelatina como estabilizante no processo de liofilização. Os autores verificaram que os produtos liofilizados apresentaram características diferentes de redispersão e que esta diferença dependeu da temperatura (-15, -20, -40 °C) e do tempo de congelamento utilizado durante o processo. O índice de ressuspensão das formulações variou de 1,2 a 1,6, tendo em vista a lenta condição de congelamento; entretanto, com a formação de pequenos tamanhos de cristais de gelo, houve uma melhor redispersão dos pós. Neste trabalho, foi demonstrado que a formação dos cristais de gelo influenciou as características de redispersão dos materiais liofilizados.

Khayata e colaboradores (2012) liofilizaram nanocápsulas de vitamina E, no qual foram utilizados quatro tipos de crioprotetores: polivinilpirrolidona, sacarose, manitol e glicose. Os produtos liofilizados utilizando a sacarose como crioprotetor foram considerados aceitáveis, apresentando índice de ressuspensão de 1,5. Os demais crioprotetores utilizados não foram capazes de proteger as nanocápsulas por apresentarem grande agregados. Para uma melhor aparência do produto liofilizado uma temperatura de desidratação da amostra igual ou abaixo da temperatura de transição vítrea do crioprotetor deve ser utilizada.

Em relação à desidratação de fármacos antifúngicos por liofilização, Kamiya e colaboradores (2006) obtiveram produtos secos a partir de nanopartículas lipídicas contendo griseofulvina, utilizando crioprotetores como a sacarose, a maltose ou a trealose a 5 % (m/v), com o intuito de aumentar sua estabilidade. Os pós liofilizados apresentaram tamanho de 55 - 65 nm, semelhantes às formulações originais (45 - 50 nm), adequada redispersão em água e estáveis por um período superior a estas.

Beirowski e colaboradores (2010) avaliaram a possibilidade de estabelecer um protocolo de liofilização padrão, especificando a temperatura de congelamento em combinação com uma adequada escolha de excipientes como crioprotetores (sacarose, polivinilpirrolidona – PVP K15 e dextrana) e estabilizantes (Poloxamer[®] 338, Cremophor[®] EL e Tween[®] 80), a fim de preservar a distribuição original de tamanho de partícula. Seis nanossuspensões contendo itraconazol como fármaco modelo foram preparadas para estudar os principais fatores que interferiam na estabilização do fármaco e as interações correspondentes. O regime de congelamento foi determinado em função da temperatura (-50 °C) e do tempo necessário para o produto solidificar. Após o congelamento, as amostras foram descongeladas, elevando a temperatura para 20 °C, com uma taxa de aquecimento

controlado de 1,0 °C/min. Este regime não apresentou influência significativa sobre a preservação original do tamanho de partícula (100 a 200 nm); entretanto, a escolha do crioprotetor e do estabilizador contribuíram para a estabilidade das nanossuspensões.

1.3 Tioconazol

O tioconazol (Figura 3) é um agente antifúngico imidazólico sintetizado e desenvolvido pela Pfizer U.K. (Sandwich, Inglaterra) e apresenta atividade inibitória *in vitro* contra uma variedade de microrganismos, incluindo leveduras patogênicas, como a *Candida albicans*; fungos dermatófitos; espécies de *Aspergillus* (SWEETMAN, 2006); clamídias; tricomonas e bactérias gram-positivas, como *Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium minutissimum* e *Staphylococcus epidermidis* (MUÑOZ et al., 2010). Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) relatados na literatura compreendem: 0,2 - 25 µg/mL para dermatófitos e 0,2 - 12,5 µg/mL para *Candida albicans*; para fungos não - dermatófitos (*Scopulariopsis brevicaulis* e *Scytalidium dimidiatum* – *Hendersonula toruloidea*), os valores são geralmente superiores a 25 µg/mL (JERVONS et al., 1979).

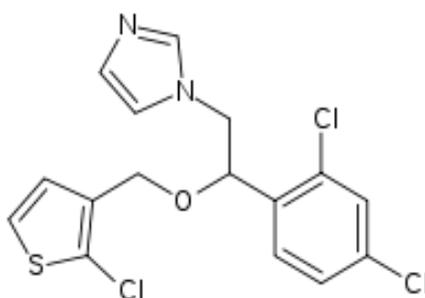


Figura 3- Estrutura química do tioconazol.

O fármaco, por apresentar um amplo espectro de ação, é indicado no tratamento tópico de micoses superficiais, especialmente as infecções fúngicas de pele e da unha (WELSH; CABRERA; WELSH, 2010), candidíase vaginal (JONES et al., 1993; NYIRJESY, 2008) e pitíriase versicolor (SWEETMAN, 2006). Além disso, se revela especialmente eficaz para o tratamento de micoses em que existem, concomitantemente, infecções por bactérias sensíveis a este fármaco (MUÑOZ et al., 2010). Cabe salientar que a sua atividade antifúngica *in vitro* contra dermatófitos, leveduras e bactérias é igual ou superior

a dos imidazóis amplamente conhecidos, como miconazol, bifonazol e clotrimazol (ODDS; WEBSTER; ABBOTT, 1984).

Em relação ao mecanismo de ação, os derivados azólicos atuam, em geral, interferindo na síntese do ergosterol, bloqueando a enzima 14- α -demetilase presente no citocromo P-450 da célula fúngica e, conseqüentemente, impedindo a desmetilação do precursor lanosterol em ergosterol, um componente importante da membrana celular dos fungos. Essa propriedade dos azóis altera a função da membrana celular, aumentando a sua permeabilidade, impedindo que esta desempenhe funções das enzimas ligadas à membrana para o desenvolvimento dos fungos (VANDEN; MARICHAL; ODDS, 1994; SINDRIM; ROCHA, 2004). O tioconazol é um antifúngico bastante efetivo, pois apresenta um duplo mecanismo de ação antifúngica, decorrente da inibição da biossíntese dos esteróis (efeito fungistático) e do dano direto causado à membrana celular desses microrganismos (efeito fungicida) (FROMTLING, 1988).

O tioconazol é indicado para as candidíase vaginal, em dose única de 300 mg, em preparações farmacêuticas como supositórios vaginais, cremes ou pomadas. No tratamento das micoses superficiais, é administrado topicamente na forma de creme, loção ou pó, na concentração de 1 %; para o tratamento de onicomicoses (infecções nas unhas) se encontra disponível em solução tópica, na concentração de 28 % (SWEETMAN, 2006; USP 35, 2012).

No tratamento de candidíase vaginal, estudos demonstraram que o tioconazol foi eficaz na redução dos sintomas e na cura micológica. Taxas de cura de 85 % e 96 % foram relatadas após administração do fármaco (óvulo vaginal – 100 mg, ou creme a 2 % – 5 g) por um período de 3, 6 e 14 dias, e na dose única (óvulo vaginal – 300 mg, ou pomada a 6 %), respectivamente (HENDERSON, 1983).

Em relação ao tratamento cutâneo, ensaios *in vivo* realizados em modelo experimental de dermatomicose em cobaias, demonstraram que a aplicação tópica de tioconazol (creme 1 e 2 %) foi bem tolerada, com mínimos efeitos adversos sistêmicos (MARRIOTT et al., 1983). Em um estudo aberto, Hay e colaboradores (1985) avaliaram a eficácia do tioconazol (solução tópica a 28 %) no tratamento de 27 pacientes com onicomicose. De seis pacientes, cinco obtiveram a cura das lesões no período de dois a sete meses de tratamento. Os demais pacientes apresentaram melhorias acentuadas. Após dois anos seguintes, em outro estudo, os autores avaliaram a eficácia da combinação de griseofulvina por via oral (500 mg administradas duas vezes ao dia) com o tioconazol em solução a 28 % (aplicado duas vezes ao dia) no tratamento de onicomicoses. Neste estudo, 69 % dos pacientes apresentaram cura e remissão micológica dentro de um ano de tratamento, enquanto que os pacientes tratados apenas com griseofulvina tiveram uma melhora de 41 % (HAY et al., 1987).

Estudos *in vitro* demonstraram que o tioconazol foi quatro vezes mais ativo do que o miconazol contra espécies de *Candida* e mais potente que o miconazol contra isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis glabrata* e várias espécies de dermatófitos; frente às espécies de *Aspergillus*, ação semelhante entre os fármacos foi observada (FROMTLING, 1988).

Em outro trabalho, Simonetti e colaboradores (2003) associaram o butilhidroxianisol (BHA), um antioxidante fenólico, com o tioconazol e avaliaram sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra microrganismos resistentes. Para *C. albicans* resistentes, o efeito máximo ocorreu após 3 minutos de contato com o microrganismo e uma rápida atividade bactericida foi também verificada para *Escherichia coli* resistente. O BHA, em baixas concentrações, aumentou a atividade do tioconazol, provavelmente devido à interação deste antioxidante com a membrana fosfolipídica dos microrganismos, afetando, assim, a organização molecular das suas membranas, possibilitando uma maior penetração do fármaco no local de ação.

A fim de avaliar a absorção percutânea e a distribuição intradérmica de antifúngicos após a aplicação tópica na pele abdominal de cobaias, uma solução de tioconazol a 1 % e creme de tioconazol a 1 % foram comparadas a solução de nitrato de miconazol (1 %) e solução de bifonazol (1 %). A penetração percutânea após aplicação da solução de tioconazol foi superior às aplicações das outras formulações, seguido do creme de tioconazol. Os autores atribuíram a absorção melhorada do tioconazol frente a outros antifúngicos devido aos efeitos farmacocinéticos favoráveis aos tecidos da pele, juntamente com sua potente atividade antifúngica, promovendo o tratamento de infecções superficiais por dermatófitos ou leveduras na pele (SOBUE; SEKIGUCHI, 2004).

A partir dos estudos encontrados na literatura, é possível verificar que altas concentrações do fármaco são necessárias para atingir o efeito terapêutico desejado, principalmente no que diz respeito ao tratamento de onicomicoses. Este fato se deve a sua baixa absorção cutânea (FROMTLING, 1988; FINCH; WARSHAM, 2007). Além disso, o uso de altas concentrações tem provocado o surgimento de sintomas indesejáveis, como alergias de contato (STUBB et al., 1992). Em um estudo realizado na Finlândia, entre os anos de 1991 a 1994, foram detectados 72 pacientes com alergia de contato decorrente do uso do tioconazol. A alta incidência das reações evidenciou o potencial sensibilizante do fármaco (HEIKKILA; STUBB; REITAMO, 1996).

Estudos recentes demonstraram o desenvolvimento de microemulsões contendo tioconazol para administração oral, a fim de aumentar a sua biodisponibilidade, reduzir as doses e aumentar a sua atividade antifúngica. Esta alternativa se deve aos efeitos colaterais

provocados pelo fármaco após aplicação tópica, como irritação local, e as dificuldades encontradas pelos pacientes de garantir uma aplicação adequada, especialmente devido ao aumento de infecções fúngicas invasivas e infecções recorrentes causadas por espécies de *Candida* e *Aspergillus*. As microemulsões contendo tioconazol aumentaram a atividade antifúngica *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* do fármaco (ATTAMA et al., 2011).

CAPÍTULO 1: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: estudo comparativo de secagem por aspensão e liofilização.

CAPÍTULO 1: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: estudo comparativo de secagem por aspersão e liofilização.

1.1 Apresentação

A secagem por aspersão, conhecida como *spray-drying* (GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012) e a liofilização (*freeze-drying*) (ABDELWAHED et al., 2006a; KHAYATA et al., 2012) são métodos bastante utilizados para a obtenção de produtos secos a partir de suspensões nanoestruturadas. A secagem por aspersão de nanocápsulas poliméricas já vem sendo estudada desde o ano 2000 (MÜLLER et al., 2000) e possui muitas vantagens, como a rapidez na preparação e maior facilidade de transposição de escala (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). Além deste, a liofilização é outro método empregado para a desidratação de suspensões de nanopartículas poliméricas (AUVILLAIN et al., 1989).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa estão sendo desenvolvidos a partir da obtenção de nanocarreadores (nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões) contendo tioconazol; no entanto, estas formulações se encontram em um meio aquoso, podendo sofrer instabilidade físico-química por fenômenos de sedimentação e possível hidrólise do polímero. Com isto, a utilização de métodos de desidratação pode minimizar estes fenômenos, já que a água é retirada do sistema.

Diante do exposto, este capítulo tem como objetivo descrever a obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas, preparadas com PCL, e nanoemulsões contendo tioconazol. As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões foram submetidas à desidratação, utilizando como adjuvante a lactose (10 %, m/v), sendo que a abordagem principal foi comparar dois métodos para tal, que utilizam diferentes princípios: evaporação a altas temperaturas (*spray-drying*) ou sublimação sob vácuo a baixas temperaturas (liofilização).

Resumo

A obtenção de produtos a partir de sistemas nanoestruturados vem como uma estratégia promissora na área farmacêutica, justamente para tentar amenizar problemas causados pelo desenvolvimento de suspensões coloidais aquosas, como a instabilidade e a contaminação microbiana. Desta forma, o foco principal deste trabalho foi a obtenção de formulações sólidas a partir de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol, este por se tratar de um antifúngico de grande espectro de ação. As formulações foram submetidas à desidratação, mediante dois métodos que operam de formas distintas: *spray-drying* (a quente) e liofilização (a frio), utilizando a lactose como adjuvante (10 %, m/v). Os produtos secos apresentaram rendimento ponderal entre 60 e 70 % e 95 e 100 % para os pós obtidos por *spray-drying* e por liofilização, respectivamente. Após redispersão dos produtos secos em água, estes apresentaram índice de redispersão de 0,7 a 1,0 e 0,9 a 1,1 para os pós obtidos por *spray-drying* e liofilização, respectivamente. Todas as formulações apresentaram teor de tioconazol entre 98 – 102 %, após preparação, e tamanho nanométrico após redispersão por via-úmida, através de difração a laser. Nas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que as partículas são arredondadas, com formas próximas a esferas, para os produtos secos obtidos por *spray-drying* e partículas mais disformes e irregulares por liofilização. Quanto à avaliação microbiológica, todos os produtos secos permaneceram com atividade frente à levedura *Candida albicans* comparado aos sistemas originais após a secagem. Os produtos secos obtidos por *spray-drying* a partir de nanocápsulas apresentaram maior controle na liberação do que os produtos secos liofilizados. Tendo em vista tais resultados, a obtenção de pós redispersíveis a partir de sistemas nanoestruturados contendo tioconazol, para o tratamento tópico de dermatofitoses, possui uma grande potencialidade de ação, contribuindo para o desenvolvimento tecnológico de formulações inovadoras.

Palavras chave: nanocápsulas; nanoemulsões; liofilização; produtos secos; *spray-drying*; tioconazol.

1 INTRODUÇÃO

O tioconazol, um fármaco sintetizado e desenvolvido pela Pfizer U.K. (Sandwich, Inglaterra) é conhecido por ser um agente antifúngico pertencente à família dos azóis, com um amplo espectro de ação frente a uma variedade de microrganismos, tais como: *Candida albicans*, fungos dermatófitos e algumas bactérias gram-positivas (SWEETMAN, 2006; MUÑOZ et al., 2010). Tendo em vista sua importante atividade, o tioconazol é indicado no tratamento tópico de micoses superficiais, especialmente as decorrentes de infecções fúngicas da pele e das unhas (WELSH; CABRERA; WELSH, 2010) e também candidíase vaginal (JONES et al., 1993). Devido a sua reduzida absorção cutânea, o tioconazol é utilizado em altas concentrações, especialmente nos casos de onicomicoses (solução tópica a 28 %) (FROMTLING, 1988), acarretando no aparecimento de algumas reações indesejáveis, tais como alergias de contato (STUBB et al., 1992), coceira, irritação local e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006). Como forma de tentar contornar estes efeitos, o desenvolvimento de formulações inovadoras é importante, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica do fármaco, podendo reduzir seus efeitos indesejáveis.

Ao longo dos anos, estudos referentes ao desenvolvimento de sistemas nanoestruturados têm sido realizados. Na área farmacêutica, estes sistemas são chamados de nanocarreadores, que podem se apresentar sobre variadas formas, tendo a possibilidade de fornecer comportamentos diferenciados, especialmente, na liberação de fármacos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Dentre os nanocarreadores, as nanocápsulas poliméricas são amplamente estudadas, as quais são estruturas vesiculares, constituídas por um núcleo oleoso, envolto por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar dissolvido ou disperso neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), enquanto que as nanoemulsões são sistemas formados por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos, dispersas na fase aquosa (BOUCHEMAL et al., 2004). Em virtude de possuírem um tamanho reduzido ($< 1 \mu\text{m}$) estes sistemas podem conferir muitas vantagens, como aumento do efeito terapêutico, uma vez que esses nanocarreadores podem promover o direcionamento do fármaco ao sítio específico de ação e, com isto, reduzir os efeitos adversos que são provocados por muitos tratamentos (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a). Quanto à aplicação tópica, os nanocarreadores podem diminuir a irritação local, além de evitar a absorção sistêmica de substâncias através da pele, e

também podem promover uma liberação prolongada/sustentada do fármaco (SHAH et al., 2007; MARCHIORI et al., 2010).

No entanto, as nanocápsulas poliméricas, após preparação, se encontram na forma de suspensão coloidal aquosa e quando armazenadas neste meio podem apresentar limitada estabilidade físico-química, como a possibilidade de hidrólise do polímero, podendo levar a perda da substância ativa encapsulada, além da agregação das partículas, sedimentação e contaminação microbiana (MAGENHEIM; BENITA, 1991; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009). Técnicas de secagem de sistemas aquosos, como a secagem por aspersão ou *spray-drying* (MÜLLER et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2006; BECK et al., 2012) e a liofilização ou *freeze-drying* (SCHAFFAZICK et al., 2003b; ABDELWAHED et al., 2006a; KHAYATA et al., 2012) são descritas na literatura e constituem alternativas tecnológicas para a conversão das suspensões coloidais em produtos secos.

A utilização da secagem por aspersão destes sistemas foi primeiramente relatada por Müller e colaboradores (2000), utilizando como adjuvante de secagem o dióxido de silício coloidal 3 % (m/v). Neste trabalho, foi possível observar a presença das nanoestruturas adsorvidas às micropartículas, com diâmetros semelhantes às suspensões originais. Estudos seguintes foram conduzidos na obtenção de produtos secos a partir de suspensões coloidais poliméricas. Beck e colaboradores (2004) empregaram métodos com uma ou duas etapas para a obtenção de micropartículas de diclofenaco utilizando o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Todos os produtos secos apresentaram nanopartículas aderidas a sua superfície, porém nem todas as formulações demonstraram bons resultados frente à tolerância gastrointestinal. Em outro estudo, a fim de obter pós redispersíveis, Tewa-Tagne e colaboradores (2007) redispersaram em água produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) utilizando a lactose como adjuvante de secagem (10 %, m/v). A dispersão aquosa apresentou tamanho médio de partícula semelhante à suspensão original. A redispersão de produtos secos contendo nanopartículas poliméricas também foi descrita em outros trabalhos (DOMINGUES, et al., 2008; KHO et al., 2010; MARCHIORI et al., 2012) e corroboram no fato desta técnica ser adequada para a obtenção de tais produtos.

No que se refere à liofilização, Auvillain e colaboradores (1989) verificaram a possibilidade de desidratação de nanocápsulas de PCL por este método, utilizando trealose como crioprotetor (30 %, m/v), a fim de preservar a integridade das nanocápsulas. Neste sentido, o congelamento rápido favoreceu melhores resultados. Schaffazick e colaboradores (2003b) empregaram dióxido de silício coloidal como adjuvante para a liofilização de

suspensões de nanocápsulas de PCL ou Eudragit[®] S90, contendo diclofenaco. Os liofilizados obtidos apresentaram, por microscopia eletrônica de varredura, micropartículas não esféricas com a superfície homogeneamente nanorrevestida. Há relatos na literatura de trabalhos que corroboram que a redispersão em água dos produtos secos liofilizados mantiveram características semelhantes às suspensões originais (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006b; ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006c; NAKAGAWA et al., 2011; KHAYATA et al., 2012).

Dentro deste contexto, a literatura demonstra a viabilidade da obtenção de produtos secos contendo nanocápsulas poliméricas empregando a secagem por aspersão e a liofilização como técnicas de desidratação; no entanto, não foram encontrados dados na literatura a respeito da comparação entre produtos secos preparados através destes dois métodos de secagem, visando avaliar a sua influência nas características físico-químicas dos pós obtidos, a partir das mesmas formulações originais. Há relatos da utilização destes métodos de forma comparativa para a secagem de outros sistemas, como lipossomas (HOVEN et al., 2012), nanopartículas preparadas pelo método de deslocamento de solvente (REBOUÇAS et al., 2012) e nanossuspensões preparadas pelo método de moagem “nanogrinding” (CERDEIRA; MAZZOTTI; GANDER, 2013). Frente ao exposto, este trabalho objetivou o desenvolvimento de produtos secos redispersíveis a partir da secagem por aspersão ou liofilização de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol. Foram avaliados, além da comparação físico-química destes produtos, o estudo de estabilidade, a eficácia antifúngica *in vitro* e a capacidade destes sistemas no controle da liberação do fármaco. Cabe salientar ainda que foram desenvolvidos produtos secos a partir de nanoemulsões contendo tioconazol para fins comparativos, afim de avaliar a influência da parede polimérica na resistência das partículas submetidas à desidratação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Tioconazol foi obtido comercialmente da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, Mn = 70,000 - 90,000) e monooleato de sorbitano (Span[®] 80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80 (Tween[®] 80) foi obtido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Triglicerídeos de cadeia média (TCM) e lactose monohidratada foram adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brasil). Metanol grau

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

2.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (NC_P-TIO) foram preparadas (n = 3) pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). A fase orgânica constituída de tioconazol (0,05 g), monooleato de sorbitano (0,385 g), triglicerídeos de cadeia média (0,8 g) e o polímero – poli(ε-caprolactona) (0,5 g) foram dissolvidos em acetona (134 mL) e esta fase foi mantida sob agitação magnética durante 60 minutos, a temperatura de 40 °C. Após, a fase orgânica foi injetada em uma fase aquosa contendo polissorbato 80 (0,385 g) e água purificada (267 mL), onde foi mantida por agitação magnética durante 10 minutos. Em seguida, a formulação foi concentrada em evaporador rotatório (40 °C) para eliminação do solvente orgânico e obtenção do volume final de 50 mL (1,0 mg/mL de tioconazol). Para fins comparativos, nanoemulsões contendo o fármaco (NE-TIO) foram, também, preparadas pelo método de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004), omitindo-se o polímero. Da mesma forma, formulações sem fármaco (NC_P-B) e (NE-B) foram, também, preparadas e avaliadas. Todas as formulações foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar e armazenadas a temperatura ambiente para posterior caracterização.

2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões

O diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) das formulações foram determinados (n = 3) por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK), a 25 ± 2 °C. Para tal, uma alíquota das amostras foi diluída em água purificada na proporção 1:500 (v/v). A determinação do pH foi realizada diretamente nas formulações, utilizando-se potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

A determinação do teor de tioconazol (n = 3) foi realizada por cromatografia líquida (CL), de acordo com metodologia previamente validada por este grupo de pesquisa (COLACRO XIV, 2012). Para a extração do fármaco, uma alíquota das amostras foi diluída em metanol, submetida ao ultrassom por 40 minutos e, após, filtrada em filtro quantitativo. Após este procedimento, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada de

0,45 μm e injetadas no cromatógrafo (Shimadzu LC-10A, equipado com bomba modelo LC-10AD, detector SPD-10A e sistema controlador SCL-10A – Kyoto, Japão). As condições utilizadas para análise compreenderam: coluna C_{18} Gemini[®] (150 mm x 4,60 mm, 5 μm) e pré-coluna C_{18} Phenomenex Security Guard; fase móvel composta de metanol:água (80:20, v/v) com ajuste de pH da água para 11,0 com hidróxido de amônia; fluxo de 1,0 mL/min.; volume de injeção de 20 μL e detecção em 219 nm.

A eficiência de encapsulamento (%) foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação utilizando como dispositivo o Amicon[®] 10.000 MW (Millipore), a 2200 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). A concentração de tioconazol livre foi determinada por CL.

2.4 Preparação e caracterização de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões

2.4.1 Secagem por aspersão (*spray-drying*)

As suspensões de nanocápsulas contendo tioconazol ($\text{NC}_P\text{-TIO}$) foram submetidas à secagem em *spray-dryer* (MSD 1.0, Labmaq, São Paulo, Brasil), empregando a lactose (10 %, m/v) como adjuvante de secagem (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007), a qual foi adicionada às suspensões e a mistura mantida sob agitação magnética durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Os pós foram preparados em triplicata ($\text{NC}_P\text{-TIO-S}$) de acordo com as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada do ar de 120 ± 5 °C, fluxo de alimentação de 0,22 L/h e diâmetro do bico do atomizador de 0,7 mm. Adicionalmente, produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO-S) foram preparados a fim de avaliar a influência da parede polimérica frente às características físico-químicas do sistema. Para comparação, formulações sem fármaco ($\text{NC}_P\text{-B-S}$) e (NE-B-S) e uma dispersão de lactose em água (10 %, m/v) (L-S) foram, também, preparadas e avaliadas.

2.4.2 Desidratação por liofilização

Neste processo, a lactose foi, também, empregada como adjuvante de crioproteção (10 %, m/v) e a preparação das amostras foi realizada conforme descrito no item 2.4.1. Em seguida, as amostras foram submetidas ao congelamento, em freezer, por 24 horas, à

temperatura de -35 ± 5 °C. Após, foram submetidas à desidratação em liofilizador (LIOTOP L 101, Liobras, São Paulo, Brasil) para obtenção dos produtos secos (NC_p-TIO-L), de acordo com as seguintes condições: temperatura inicial do processo de -45 ± 5 °C, pressão do vácuo menor do que 500 µHg e tempo de permanência no aparelho de 48 horas. Da mesma forma, produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO-L) foram preparados para fins comparativos. Formulações sem fármaco (NC_p-B-L) e (NE-B-L) e uma dispersão de lactose em água (10 %, m/v) (L-L) foram, também, preparadas e avaliadas.

Em ambos os processos, os produtos secos foram preparados em triplicata, acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados em dessecador para posterior caracterização.

2.4.3 Rendimento ponderal

O rendimento do processo de secagem (%) foi calculado pela razão entre o peso do pó obtido experimentalmente e a soma dos pesos de todas as matérias-primas empregadas em cada formulação (descontando o conteúdo de água), conforme a equação 1:

$$(1) \quad R \% = \left[\frac{\text{Peso do pó obtido experimentalmente}}{\text{Peso total das matérias-primas}} \right] \times 100$$

2.4.4 Determinação do teor de fármaco

Para a determinação do teor de tioconazol nos produtos secos, as amostras foram pesadas e dispersas em metanol, mantidas sob agitação magnética durante 15 minutos e filtradas em filtro quantitativo. Uma alíquota dessa dispersão foi retirada e diluída novamente em metanol para se obter uma concentração final de 20 µg/mL de tioconazol. Após este procedimento, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo, sob as mesmas condições de análise descritas no item 2.3. Para avaliar a pureza do pico do tioconazol, as amostras foram analisadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com uma bomba modelo LC-20AT, com detector de arranjo de diodos (SPD-M20A PDA) e sistema controlador CBM-20A.

2.4.4.1 Validação do método analítico

O método para a quantificação do tioconazol nos produtos secos obtidos a partir de suspensão de nanocápsulas e nanoemulsões foi previamente validado seguindo os parâmetros de: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A especificidade foi determinada pela análise dos produtos secos obtidos a partir das nanocápsulas sem fármaco (NC_p-B-S) pulverizadas em *spray-dryer*. As amostras foram diluídas da mesma forma que as amostras contendo o fármaco. A curva analítica foi preparada (n = 3) a partir de uma solução de 1000 µg/mL de tioconazol, a fim de obter as concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. A linearidade foi avaliada pelo estudo de regressão linear, mediante o método dos mínimos quadrados e analisada por Análise de Variância (ANOVA). A partir da curva analítica se pode obter os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) que foram calculados de acordo com as equações 2 e 3 (ICH, 2005).

$$(2) \quad LD = 3,3 \times DP / S$$

$$(3) \quad LQ = 10 \times DP / S$$

Onde, S é a inclinação da curva analítica e DP é o desvio padrão da resposta.

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (precisão intradia) e pela precisão intermediária (entre dias), calculando-se o desvio padrão relativo (DPR). Seis amostras independentes no mesmo dia foram analisadas, na mesma concentração de tioconazol (20 µg/mL) (repetibilidade), e três amostras independentes em três dias diferentes sob as mesmas condições experimentais (precisão intermediária). A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação (n = 3), no qual o percentual de recuperação foi calculado pela diferença entre as áreas das concentrações obtidas com acréscimo ou não de solução padrão (AOAC, 2000). O tioconazol foi extraído dos produtos secos na concentração de 10 µg/mL. A estas soluções foram adicionadas quantidades de solução padrão a fim de se obter concentrações finais de 16, 20 e 24 µg/mL, que correspondem, respectivamente, a 80, 100 e 120 % da concentração utilizada da análise (20 µg/mL). Os produtos secos obtidos de nanocápsulas pulverizados em *spray-dryer* foram utilizados para a determinação da precisão e da exatidão do método analítico.

2.4.5 Avaliação da distribuição de tamanho de partículas

O perfil de desaglomeração das partículas secas foi avaliado em função do tempo, após a sua dispersão em água, por difração a laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern, UK). As alíquotas foram analisadas em intervalos de 0, 5, 15, 30 e 60 minutos. Estas análises foram realizadas na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

2.4.6 Determinação do diâmetro médio das partículas após redispersão dos pós em água

O diâmetro médio das partículas foi medido por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments), a 25 ± 2 °C. Os produtos secos foram pesados e redispersos em água ultrapura ($n = 3$) a fim de se obter uma concentração final de 1,0 mg/mL de tioconazol, de acordo com a suspensão original. Cada amostra foi submetida à agitação magnética por 5 minutos e, após, uma alíquota foi retirada e diluída em água purificada na proporção 1:500 (v/v), seguida de filtração em membrana hidrofílica (0,45 μ m). Também foi calculado o índice de ressuspensão das partículas, o qual representa a recuperação do tamanho médio de partículas em relação às formulações de origem. É calculado através da relação entre o tamanho médio das partículas dos pós após a redispersão em água (tamanho final) e o tamanho médio das suspensões (tamanho inicial), conforme a equação 4.

$$(4) \quad \text{Índice de ressuspensão} = S_f / S_i$$

Onde, S_f é o diâmetro médio das partículas dos produtos secos após redispersão em água e S_i é o diâmetro médio das partículas das formulações originais.

2.4.7 Determinação do teor de umidade residual

O conteúdo de água dos produtos secos (%) foi determinado pelo método de Karl Fischer (Karl Fischer Metrohm 787 e agitador Ti Stand 703, São Paulo, Brasil), empregando-se quantidades de 40 a 50 mg dos pós ($n = 3$) para a titulação (F. Bras. V, 2010).

2.4.8 Análise morfológica

Os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S e NE-TIO-L), assim como a lactose submetida aos processos de secagem (L-S) e (L-L) foram analisadas quanto à forma e à superfície por microscopia eletrônica de varredura (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tóquio, Japão), em diferentes aumentos, após a metalização das amostras com ouro. Esta análise foi realizada junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

2.5 Estudo de estabilidade

Para o estudo, as suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões, assim como os produtos secos obtidos de tais formulações foram avaliados após a preparação (tempo zero) e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Foram monitorados os seguintes parâmetros: teor, diâmetro médio de partículas e o índice de polidispersão (este determinado somente para as nanocápsulas e nanoemulsões).

2.6 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método microbiológico de difusão em ágar com pocinhos (F. Bras. V, 2010), no qual se mede o halo de inibição do crescimento do microrganismo formado pela ação do fármaco sobre o mesmo. Neste ensaio, o microrganismo empregado foi a levedura de *Candida albicans* ATCC 10231, mantida em ágar Sabouraud-dextrose 4 % (SAD), por 48 horas, a temperatura de 25 ± 2 °C (tubo inclinado). O inóculo utilizado foi a 1 % (v/v), após o preparo da suspensão do microrganismo em solução salina estéril, a uma concentração de 25 ± 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).

Uma alíquota das amostras (suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão contendo tioconazol; produtos secos contendo tioconazol associado à suspensão de nanocápsulas e nanoemulsões e solução padrão de tioconazol) foi diluída em água purificada para se obter uma concentração final de 2,0 µg/mL de tioconazol. Os produtos secos foram previamente pesados e redispersos em água purificada. As amostras sem fármaco (suspensão de

nanocápsulas e nanoemulsões brancas e produtos secos obtidos a partir destas) foram, também, avaliadas e diluídas na mesma proporção que as amostras contendo tioconazol.

Para cada amostra, utilizaram-se grupos de seis placas de Petri, as quais continham 20 mL de meio SAD como camada base e 5 mL de inóculo. Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram colocadas, individualmente, em cada orifício (9,5 mm de diâmetro). As placas foram incubadas em estufa, à temperatura de 35 ± 5 °C, por 24 horas, e após este período, o diâmetro dos halos de inibição foi determinado (mm) com o auxílio de paquímetro digital (Paquímetro Eletrônico Digital Starrett, 727).

2.7 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos

A avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos ($n = 3$) foi estudada pela técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA), de acordo com a condição *sink*, utilizando como meio de liberação água: etanol (70:30, v/v). Para o ensaio, os produtos secos foram previamente pesados e redispersos em 5 mL de água purificada, a fim de obter uma concentração inicial de 1,0 mg/mL de tioconazol. Para comparação, uma solução etanólica contendo o fármaco não associado aos nanocarreadores (1,0 mg/mL) foi avaliada. Os sacos de diálise contendo 1,0 mL das amostras em estudo foram colocados em béqueres contendo 200 mL de meio de liberação, mantidos sob agitação magnética, a temperatura de 35 °C. Alíquotas de 1,0 mL de meio foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, repondo-se o mesmo volume de meio fresco, e filtradas em membrana de 0,45 µm. A concentração de tioconazol liberada em cada tempo foi determinada por CL sob as mesmas condições de análise descritas no item 2.3. No entanto, devido às baixas concentrações de liberação do fármaco detectadas nos tempos iniciais, uma nova validação do método foi realizada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os perfis de liberação *in vitro* do fármaco, a partir das formulações, foram analisados mediante modelagem matemática (MicroMath Scientist[®] for Windows[™]), empregando os seguintes modelos dependentes: ordem zero (Eq. 5) (COSTA; LOBO, 2001), monoexponencial (Eq. 6), biexponencial (Eq. 7) (CRUZ et al., 2006) e Lei das Potências (Eq. 8) (PEPPAS, 1985).

$$(5) \quad C = C_0 + kt$$

$$(6) \quad C = C_0 e^{-kt}$$

$$(7) \quad C = a e^{-k_1t} + b e^{-k_2t}$$

$$(8) \quad f_t = at^n$$

Onde, C_0 , a e b são as concentrações iniciais do fármaco; k , k_1 e k_2 são as constantes de velocidade de liberação do fármaco. Na equação 8, f_t é a fração de fármaco liberada no tempo t (horas); a é constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação; n é o expoente que indica o mecanismo de liberação do fármaco. Para sistemas esféricos, o expoente n pode assumir valores de 0,43 (difusão Fickiana); entre 0,43 e 0,85 (transporte anômalo); 0,85 ou maior que 0,85 (transporte Caso II).

O melhor modelo foi selecionado baseado no melhor coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente avaliados, em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão, através da 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 das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões

As amostras, após preparação, apresentaram-se homogêneas, com aspecto branco leitoso e reflexo azulado (efeito *Tyndall*). Esta característica é devido ao tamanho

nanométrico e ao movimento Browniano destas partículas em suspensão (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC_P-TIO) e nanoemulsões (NE-TIO) contendo tioconazol (1,0 mg/mL) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC_P-B e NE-B), (n = 3, média ± s)

Formulação	pH	Tamanho médio de partícula (nm)	PDI*	Teor (%)
NC _P -TIO	5,88 ± 0,03	206 ± 03	0,13 ± 0,01	99,55 ± 0,85
NC _P -B	5,44 ± 0,03	195 ± 02	0,09 ± 0,01	-
NE-TIO	6,25 ± 0,01	182 ± 04	0,11 ± 0,02	98,69 ± 0,47
NE-B	5,82 ± 0,01	171 ± 02	0,07 ± 0,01	-

*PDI: índice de polidispersão

Através dos resultados, verificou-se que as nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula na faixa nanométrica (em torno de 200 nm) e índice de polidispersão inferior a 0,20, indicando uma adequada uniformidade de tamanho do sistema. Estes resultados corroboram com outros encontrados na literatura para o mesmo tipo de nanocarreador (OURIQUE et al., 2008, MARCHIORI et al., 2010). Diferenças significativas foram observadas em relação às nanocápsulas sem fármaco ($p < 0,05$), demonstrando que a presença do fármaco pode ter influenciado o tamanho médio de partículas das formulações. Em relação ao pH, as nanocápsulas contendo tioconazol apresentaram pH ácido (5,88) devido as características dos componentes presentes nas formulações. Diferenças significativas foram, novamente, observadas em relação às nanocápsulas sem fármaco ($p < 0,05$).

Nanoemulsões foram, também, preparadas a fim de verificar diferenças entre as nanoestruturas, principalmente quanto à presença da parede polimérica. As nanoemulsões apresentaram tamanho de partícula na faixa nanométrica (182 nm), porém inferior às nanocápsulas, e índice de polidispersão abaixo de 0,20. No que se refere ao pH, as nanoemulsões contendo tioconazol apresentaram pH levemente ácido (6,25), diferindo-se, significativamente, das nanocápsulas. Esta diferença pode ser atribuída à presença do polímero nas nanocápsulas, uma vez que a PCL possui grupos ácido carboxílicos terminais presentes na sua estrutura, que podem acarretar em valores de pH mais baixos. Além disso,

em comparação com as nanoemulsões sem o fármaco, diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$).

O teor de tioconazol nas formulações (NC_P-TIO e NE-TIO) foi entre 98 – 100 % e próximo ao valor teórico (1,0 mg/mL), e a eficiência de encapsulamento do fármaco associado aos nanocarreadores foi de, aproximadamente, 100 %.

3.2 Caracterização físico-química dos produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões

Após o desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC_P-TIO e NE-TIO), estas foram submetidas à secagem por aspersão ou liofilização utilizando a lactose (10 %, m/v) como adjuvante. A lactose por ser um excipiente solúvel em água tem uma maior capacidade de redispersão aquosa, o que é essencial para que seja alcançada a permanência das características iniciais das formulações originais, além de apresentar uma alta temperatura de transição vítrea (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; KHO et al., 2010) de aproximadamente 104 °C (ISLAM; LANGRISH, 2010). Além disso, pode ser utilizada como crioprotetor frente à liofilização (WESSMAN; EDWARDS; MAHLIN, 2010), pois os sacarídeos possuem a capacidade de promover um espaçamento entre as partículas podendo impedir a agregação destas (VAN WINDEN; TALSMA; CROMMELIN, 1998).

Após a obtenção dos produtos secos, estes apresentaram coloração branca, característico das formulações líquidas de origem e da lactose, e ausência de odor. Na tabela 2 estão apresentadas as características físico-químicas dos pós obtidos pelos dois métodos de secagem: *spray-drying* e liofilização.

Tabela 2 - Caracterização físico-química dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC_P-TIO-S) e nanoemulsões (NE-TIO-S) contendo tioconazol por *spray-drying* e por liofilização (NC_P-TIO-L e NE-TIO-L) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC_P-B-S, NE-B-S, NC_P-B-L e NE-B-L) (n = 3, média ± s)

Formulação	Rendimento (%)	Teor (%)
NC _P -TIO-S	58 ± 02	99,80 ± 0,97
NC _P -B-S	64 ± 02	-
NE-TIO-S	67 ± 01	100,02 ± 0,37
NE-B-S	64 ± 03	-
NC _P -TIO-L	95 ± 01	100,06 ± 1,81
NC _P -B-L	98 ± 01	-
NE-TIO-L	99 ± 01	101,95 ± 0,28
NE-B-L	98 ± 01	-

Quanto ao rendimento do processo de secagem, os resultados obtidos pela secagem por aspersão (*spray-drying*) foram de 60 – 70 %. De acordo com a literatura, estes valores são semelhantes aos encontrados por Tewa-Tagne e colaboradores (2007). Cabe ressaltar que o rendimento percentual obtido na secagem das nanocápsulas contendo tioconazol foi superior aos valores encontrados em outros trabalhos, os quais, também, empregaram a lactose como adjuvante se secagem, na mesma proporção (HOFFMEISTER et al. 2012; MARCHIORI et al., 2012). Empregando a liofilização, os rendimentos percentuais obtidos foram de 95 – 100 %, superiores aos obtidos na secagem por *spray-drying*, o que é esperado neste processo.

Para a determinação do teor de fármaco nos produtos secos o método analítico foi validado. Quanto às condições cromatográficas escolhidas, estas foram de acordo com referência da literatura (USP 35, 2012) sofrendo algumas adaptações. O método se mostrou específico, pois não houve interferência dos excipientes na quantificação do fármaco (Apêndice A). Este resultado foi confirmado pela análise da pureza do pico específico (índice de pureza do pico = 1,000). O método analítico foi linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL ($y = 52105x - 386,7$; $r^2 = 0,9999$). Através da análise estatística, verificou-se regressão significativa ($F_{\text{calculado}} = 64256,05 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$) e ausência de desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 1,74 < F_{\text{tabelado}} = 3,26$). Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 0,18 µg/mL e 0,61 µg/mL. O método foi preciso

(DPR = 1,31 % e 1,24 % para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e exato (recuperação = $99,98 \pm 1,33$ %) de acordo com as condições analíticas empregadas, no tempo de retenção do fármaco de 7,2 minutos.

O teor de tioconazol nos produtos secos (Tabela 2), após a preparação, foi entre 98 – 102 % e próximo ao valor teórico (7,02 mg/g e 7,55 mg/g para os pós obtidos a partir das nanocápsulas e nanoemulsões, respectivamente). Desta forma, é possível afirmar que não houve degradação ou perda seletiva do fármaco durante o processo de desidratação das formulações.

Os produtos secos foram avaliados por difração a laser após a sua dispersão em água purificada, a fim de verificar a presença de partículas de tamanhos nanométrico ou micrométricos e acompanhar o perfil de desaglomeração. O perfil de distribuição das partículas foi comparado com as nanocápsulas e nanoemulsões originais. Os resultados obtidos se encontram representados na figura 1. Antes dos sistemas sofrerem o processo de desidratação, as nanocápsulas (NC_P-TIO) apresentaram pico unimodal na faixa nanométrica e as nanoemulsões (NE-TIO), além do pico nanométrico, verificou-se a presença de populações micrométricas. Após a redispersão, NC_P-TIO-S apresentou dois picos, um deles correspondendo a uma população micrométrica elevada e outro apresentando uma população de partículas intermediárias, com a presença de uma população na faixa nanométrica. Após 60 minutos de análise, a intensidade do pico da população nanométrica diminuiu, mas a quantidade de nanopartículas com tamanhos menores aumentou (Figura 1A). Após redispersão, NE-TIO-S apresentou um perfil semelhante à formulação líquida original (Figura 1B). Para os produtos secos obtidos por liofilização, após ser submetida à redispersão, NC_P-TIO-L apresentou dois picos populacionais, um pequeno com população micrométrica e outro maior com populações intermediárias; após 60 minutos, a população micrométrica acima de 5,0 µm diminuiu (Figura 1C). Ainda, após a redispersão, NE-TIO-L apresentou picos semelhantes aos da NC_P-TIO-L, um com uma quantidade muito pequena de população micrométrica acima de 5,0 µm, e outro com uma população de partículas intermediárias micro e nanométricas; após 60 minutos, houve ausência do menor pico e o outro permaneceu semelhante (Figura 1D). Através destes resultados verifica-se que existe, em todas as formulações avaliadas, a presença de populações nanométricas, umas com maior intensidade que as outras, dependendo do tipo de secagem e do sistema nanoestruturado de origem. Estes resultados confirmam a eficiência da redispersão de tais sistemas atingindo tamanho nanométrico, podendo recuperar, parcialmente ou totalmente, o tamanho dos sistemas nanoestruturados originais.

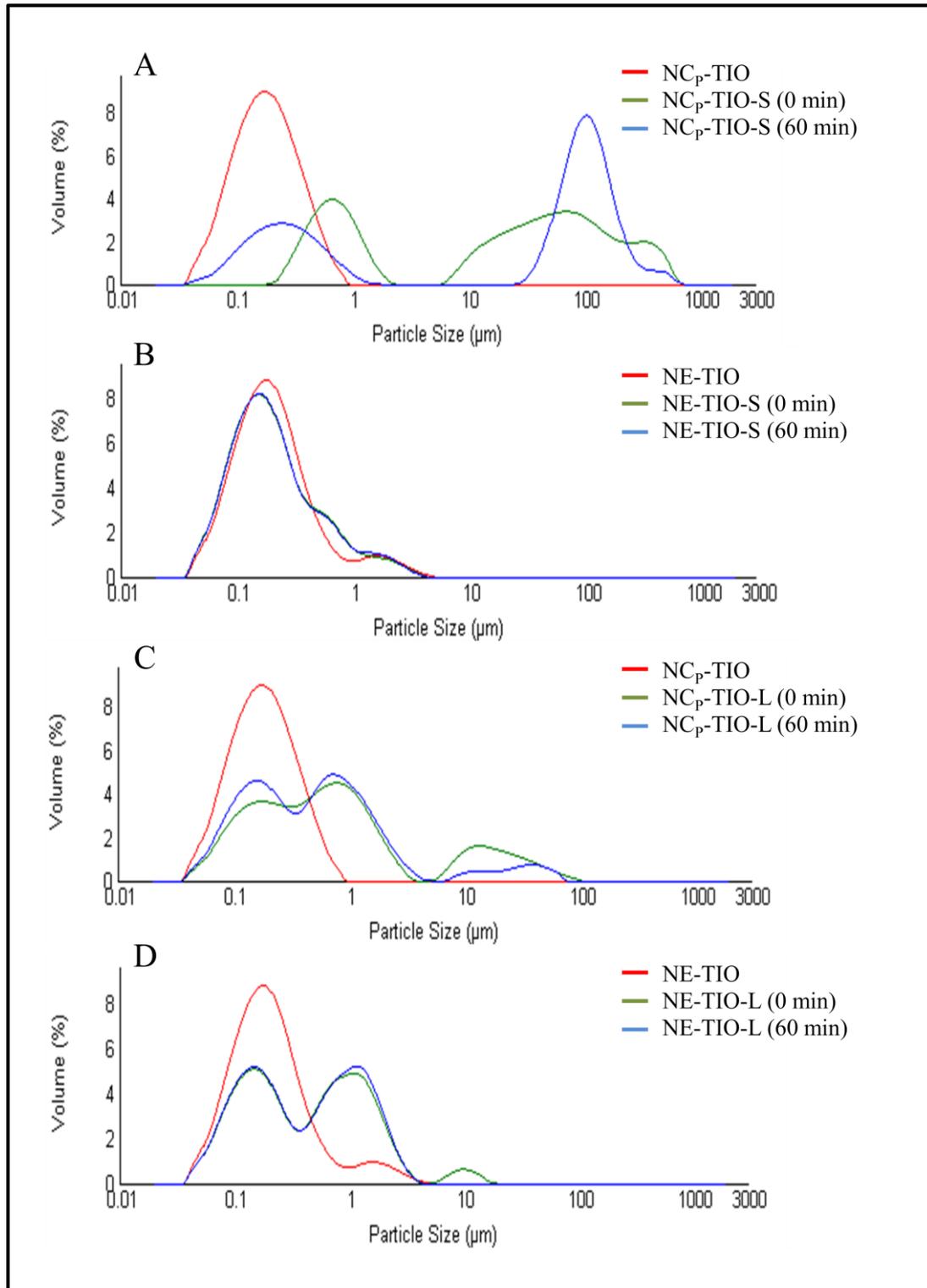


Figura 1- Distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol ($\text{NC}_p\text{-TIO}$ e NE-TIO , respectivamente) e as análises por via-úmida nos tempos de 0 e 60 minutos para $\text{NC}_p\text{-TIO-S}$ (A), NE-TIO-S (B), $\text{NC}_p\text{-TIO-L}$ (C) e NE-TIO-L (D).

Com o objetivo de verificar a recuperação de tamanho nanométrico das formulações originais, a análise por espectroscopia de correlação de fótons foi realizada e os índices de

ressuspensão (Sf/Si) calculados, sendo que quanto mais próximos de 1, maior é a recuperação das formulações originais (Figura 2). Para tal, os produtos secos foram redispersos em água purificada e mantidos sob agitação magnética por 5 minutos para posterior análise. Cabe salientar que esta condição foi estabelecida a partir de estudos prévios utilizando diferentes tempos de agitação (5, 15, 30 e 60 minutos), não havendo diferença quanto ao tamanho de partícula em relação ao tempo de agitação.

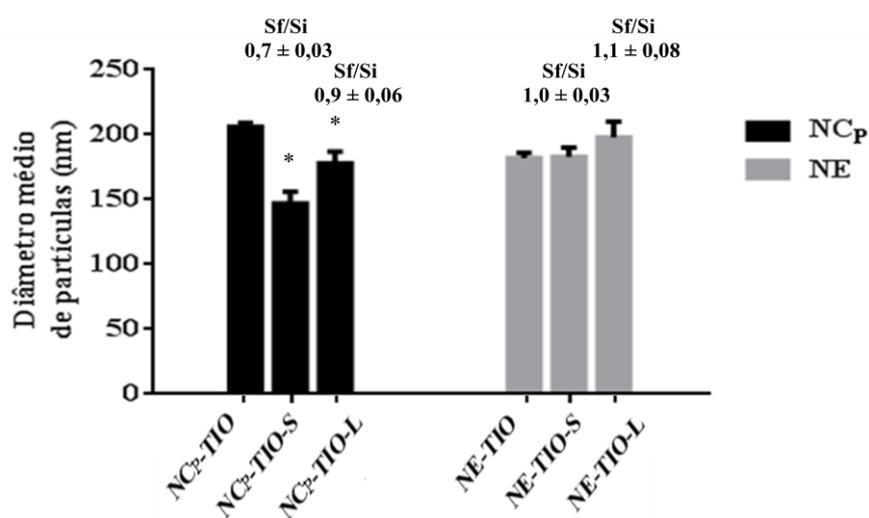


Figura 2 - Diâmetro médio das partículas de suspensões de nanocapsulas contendo tioconazol (NC_p-TIO) e os respectivos produtos secos após redispersão em água (NC_p-TIO-S e NC_p-TIO-L); nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO) e os respectivos produtos secos (NE-TIO-S e NE-TIO-L). Sf/Si= índices de ressuspensão dos produtos secos relativos à formulação de origem; * Diferença significativa em relação à suspensão original.

Após a redispersão dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol pelo método de *spray-drying* (NC_p-TIO-S), o tamanho médio de partículas foi de 147 ± 09 nm e o Sf/Si = 0,7. Esta pequena variação no índice de ressuspensão também foi observada por KHO e colaboradores (2010), os quais empregaram a secagem por aspersão de nanopartículas de PCL utilizando lactose-leucina como adjuvante de secagem; no entanto, o melhor índice de ressuspensão encontrado foi de 1,5. Esta diferença de valores no índice de ressuspensão os autores atribuem ao ponto de fusão da PCL que é cerca de 60 °C. Desta forma, a temperatura elevada durante o processo de secagem no *spray-dryer* pode gerar fusão parcial ou total da parede polimérica, sofrendo um novo rearranjo molecular em sua estrutura. Esta ação pode ser moderada pelo baixo tempo de permanência das partículas no equipamento. Diferenças estatísticas não foram observadas em relação às formulações sem fármaco (NC_p-B-S) que apresentaram partículas de tamanho médio de 141 ± 07 nm e Sf/Si = $0,7 \pm 0,04$ ($p > 0,05$).

Na secagem de nanoemulsões contendo tioconazol pelo método de *spray-drying* (NE-TIO-S), o tamanho médio das partículas após a redispersão dos pós foi de 183 ± 07 nm e o índice de ressuspensão igual a 1,0. Este resultado demonstrou total recuperação do tamanho médio de partículas do produto seco em relação a sua formulação de origem, ou seja, preservou a integridade das nanoemulsões originais. Estudos corroboram com os valores encontrados para nanoemulsões contendo tretinoína utilizando o mesmo adjuvante de secagem, a lactose ($Sf/Si = 1,0$) (MARCHIORI et al., 2012). Em outro trabalho, Li e colaboradores (2010) utilizaram diferentes adjuvantes de secagem para obtenção de produtos secos a partir de nanoemulsões lipídicas e seus resultados foram satisfatórios (valor de $Sf/Si = 1,2$ utilizando goma arábica como adjuvante de secagem), concluindo que o processo de secagem foi capaz de preservar a integridade dos sistemas nanoestruturados. Diferenças estatísticas em relação à formulação sem fármaco (NE-B-S) foram observadas, nos quais apresentaram tamanho após redispersão dos pós de 152 ± 08 nm e índice de ressuspensão de $0,9 \pm 0,05$ ($p < 0,05$).

Após a redispersão dos produtos secos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol, pelo método de liofilização (NC_P-TIO-L), o diâmetro médio de partículas foi de 178 ± 09 nm e $Sf/Si = 0,9$. Resultados semelhantes foram reportados na literatura em relação aos valores de índice de ressuspensão. Abdelwahed e colaboradores (2006c) estudaram a utilização de excipientes amorfos na estabilização de nanocápsulas de PCL submetidas à liofilização. Foram utilizados a sacarose, glicose, polivinilpirrolidona e hidroxipropil- β -ciclodextrina como excipientes a 5 % (m/v), no qual todos os produtos secos após redispersão obtiveram resultados satisfatórios ($Sf/Si = 0,9 - 1,0$), confirmando a importância do estado amorfo do crioprotetor para assegurar uma boa ação protetora para as nanocápsulas durante o seu processo congelamento. Nakagawa e colaboradores (2011) avaliaram diferentes temperaturas de congelamento na obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas de PCL utilizando uma solução de gelatina como estabilizante ($Sf/Si \geq 1,2$); os valores mais elevados do que 1,2 (maioria) foram atribuídos ao processo de congelamento, pois o estresse físico causado pelo crescimento de cristais de gelo influenciou nas características de dispersão dos materiais liofilizados. Diferenças estatísticas não foram observadas em relação à formulação sem fármaco (NC_P-B-L) que apresentou tamanho médio de partículas de 203 ± 17 nm e $Sf/Si = 1,0 \pm 0,10$ ($p > 0,05$). Em relação aos produtos secos preparados a partir de nanoemulsões contendo tioconazol pelo método de liofilização (NE-TIO-L), os pós, após redispersão, apresentaram tamanho médio de 198 ± 12 nm e $Sf/Si = 1,1$. Estes resultados corroboram com os encontrados por Burapapadh e colaboradores (2012) na obtenção de

produtos secos a partir de nanoemulsões lipídicas de itraconazol (valores de índice de ressuspensão em água e fluido gástrico simulado sem pepsina de 1,1 e 1,0, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatísticas em relação à formulação sem fármaco (NE-B-L) que apresentou tamanho médio de partículas de 219 ± 44 nm e Sf/Si $1,3 \pm 0,24$ ($p > 0,05$).

Para comparação, avaliou-se, também, o tamanho médio de partículas por espectroscopia de correlação de fótons da lactose submetida aos processos de desidratação e posterior redispersão em água, a fim de verificar se o adjuvante de secagem poderia influenciar no tamanho de partícula dos sistemas nanoestruturados após desidratação. A lactose obtida por *spray-drying* (L-S) e por liofilização (L-L) apresentou valores de 227 ± 13 nm e 287 ± 10 nm, respectivamente, demonstrando que a presença das nanoestruturas não causou aumento de tamanho médio de partículas, sendo que o sistema nanocápsula/lactose ou nanoemulsão/lactose retomou praticamente o tamanho original.

Na figura 3 está representado o perfil de distribuição do tamanho médio das partículas das formulações líquidas originais em relação aos seus respectivos produtos secos redispersos em água obtidos pelos processos de desidratação (*spray-drying* e liofilização), demonstrando que a sobreposição dos picos relacionados ao diâmetro médio de partículas, por espectroscopia de correlação de fótons, foi capaz de manter total ou parcialmente a integridade das partículas de origem.

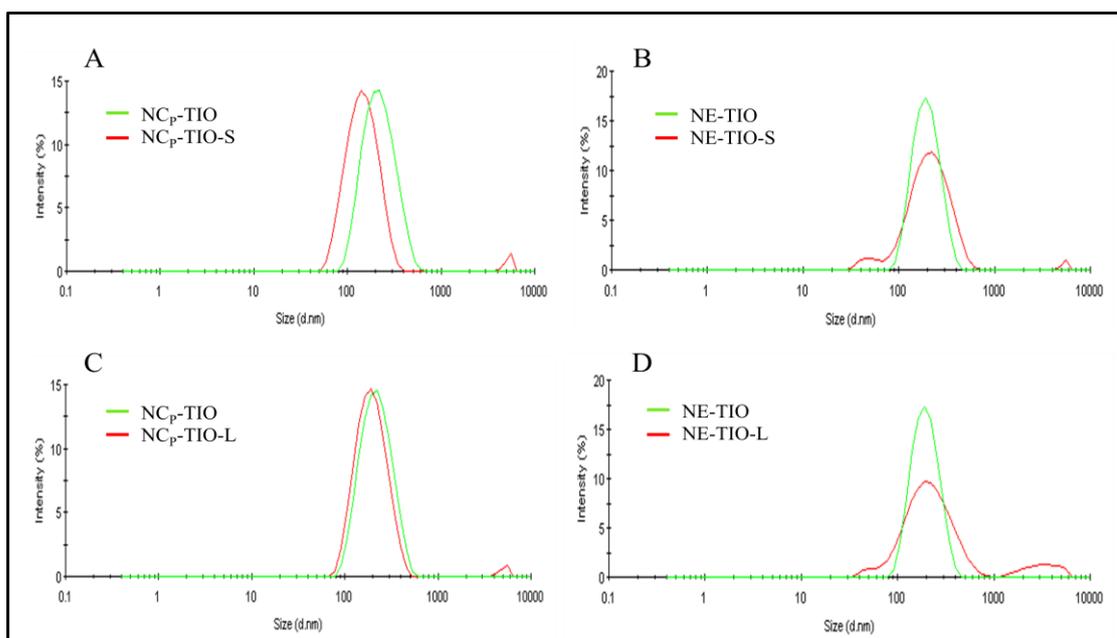


Figura 3 - Distribuição do tamanho médio das partículas por espectroscopia de correlação de fótons das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC_p-TIO e NE-TIO) e as respectivas redispersões dos produtos secos em água da NC_p-TIO-S (A), NE-TIO-S (B), NC_p-TIO-L (C) e NE-TIO-L (D).

A análise morfológica dos produtos secos e do adjuvante de secagem foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as imagens estão apresentadas na figura 4. Quanto à secagem por *spray-drying*, os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_P-TIO-S) apresentaram partículas arredondadas, de superfície lisa (Figura 4A); os produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO-S) apresentaram morfologia semelhante à NC_P-TIO-S (Figura 4B), os quais a parede polimérica não influenciou na morfologia de tais formulações. Os resultados obtidos para os produtos secos preparados a partir de nanocápsulas foram semelhantes aos encontrados por MARCHIORI e colaboradores (2012) na secagem de nanocápsulas de PCL contendo tretinoína. Cabe salientar que, em ambas as formulações, a presença das nanoestruturas não pode ser observada, provavelmente, por estas estarem incluídas na matriz de lactose (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007). Na secagem por aspersão é esperada a obtenção de partículas esféricas (mais regulares) devido ao processo de formação das gotículas a partir das formulações líquidas, que passam a ser atomizadas e com o contato com o calor formam o pó. O tamanho das partículas geralmente é controlado pela variação das condições instrumentais, incluindo o diâmetro do bocal, a pressão de atomização, bem como, a tensão superficial (KAWAKAMI et al., 2010).

Pelo método de liofilização, os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_P-TIO-L) apresentaram partículas com bordas mais irregulares e disformes, com superfície rugosa (Figura 4C). Os produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões contendo tioconazol (NE-TIO-L) também apresentaram partículas com bordas irregulares e disformes, que podem ser visualizadas em um menor aumento (Figura 4D), pelo qual novamente a presença da parede polimérica nas nanocápsulas não influenciou na morfologia das partículas. Abdelwahed e colaboradores (2006c) desenvolveram produtos secos a partir de nanocápsulas utilizando também um açúcar (sacarose) como crioprotetor e verificaram a presença de partículas com porosidade em sua estrutura, indicando, possivelmente, a ocorrência de um colapso de pequena escala no produto seco. Este efeito pode ocorrer quando o produto é aquecido acima da sua temperatura de transição vítrea durante a etapa de sublimação da amostra, ocasionando pequenos orifícios na porção seca da matriz congelada (OVERCASHIER; PATAPOFF; HSU, 1999). A utilização de adjuvantes amorfos e a presença de grandes poros nas partículas dos produtos liofilizados, devido aos espaços ocupados anteriormente pelo gelo, também podem colaborar com as irregularidades (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006d). Da mesma forma, a presença das nanoestruturas não foi, também, verificada nos produtos secos obtidos por liofilização.

Para comparação, uma dispersão de lactose 10 % (m/v) em água foi submetida à secagem por aspersão (L-S) ou liofilização (L-L), a fim de verificar o comportamento do adjuvante após ser submetido ao processo de secagem. A análise microscópica após desidratação por *spray-drying* revelou a presença de algumas partículas arredondadas, porosas e com ampla distribuição de tamanho (Figura 4E). Partículas irregulares foram verificadas na amostra submetida à liofilização (Figura 4F). Diferenças morfológicas entre os produtos secos obtidos pelos dois métodos de desidratação, *spray-drying* e liofilização, foram observadas, o qual pode ser também evidenciado pelo comportamento do adjuvante submetido a tais processos, como o esperado, em função dos distintos mecanismos de desidratação.

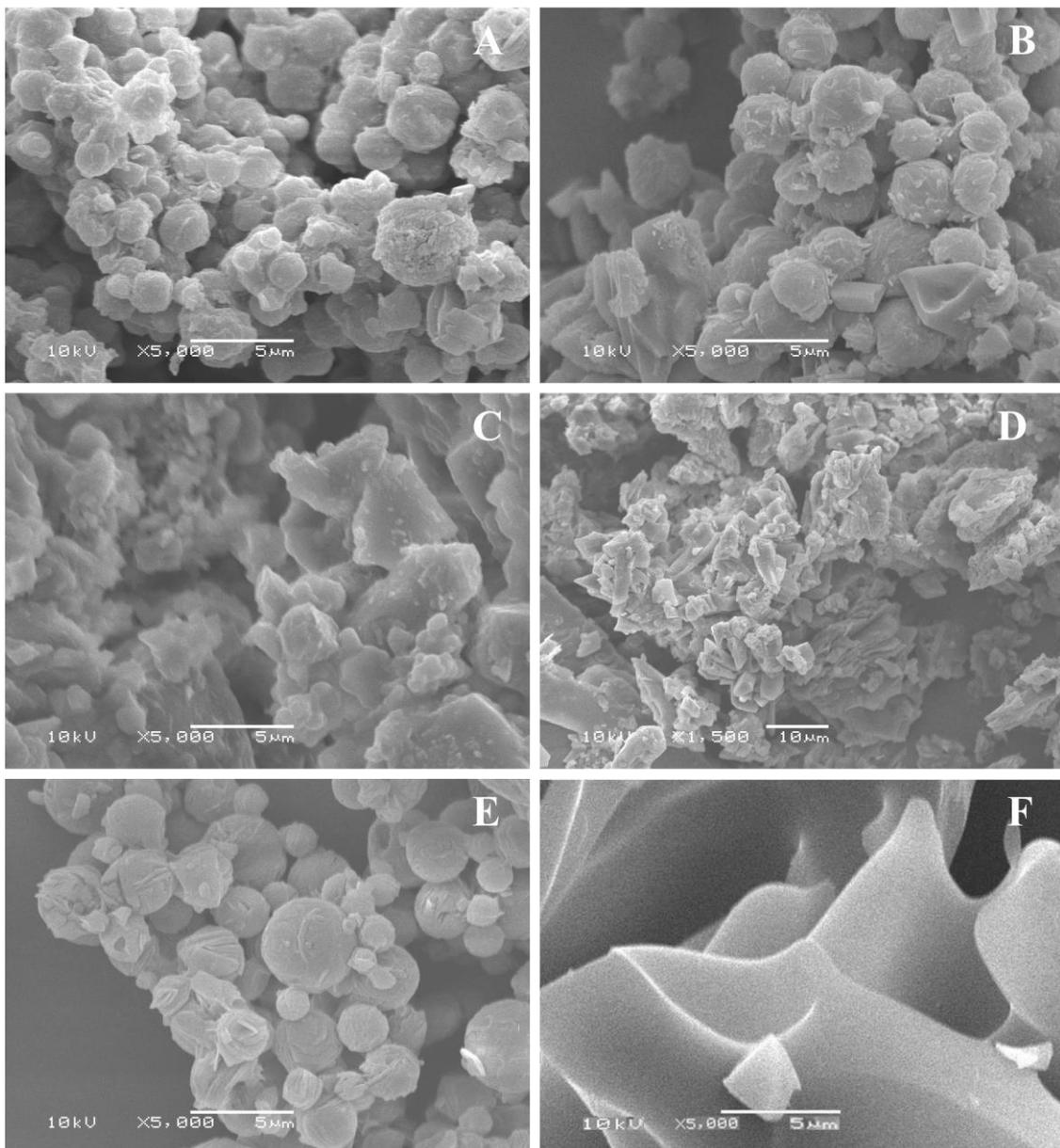


Figura 4 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos produtos secos. NC_P-TIO-S (A), NE-TIO-S (B), NC_P-TIO-L (C), NE-TIO-L (D), L-S (E), L-L (F). [A, B,C, E e F (5,000x); D (1,500x)].

A determinação do teor de umidade residual dos produtos secos a partir de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol foi determinada por Karl Fischer e os valores obtidos compreenderam: $2,39 \pm 0,18$ %; $3,06 \pm 0,06$ %; $3,15 \pm 0,09$ % e $4,13 \pm 0,11$ % para NC_P-TIO-S, NE-TIO-S, NC_P-TIO-L e NE-TIO-L, respectivamente. Os resultados encontrados foram satisfatórios, uma vez que o teor de umidade na monografia da lactose monohidratada pelo método do Karl Fischer, especificado pela Farmacopéia Americana (USP 35, 2012), é entre 4,5 e 5,5 %. Além disso, comparado a mesma técnica de desidratação, os pós preparados a partir das nanoemulsões apresentaram valores de umidade residual mais elevada que os pós obtidos a partir das nanocápsulas ($p < 0,05$). Cabe salientar que o aumento da concentração de sólidos na formulação (com polímero) levou a um produto com menor teor de umidade, pelo fato de se ter reduzido a quantidade de água a ser removida durante o processo de desidratação. Em relação aos pós preparados a partir das nanocápsulas, o teor de umidade residual obtido na secagem por aspersão foi semelhante aos encontrados por Tewa-Tagne e colaboradores (2007) utilizando a lactose como adjuvante, na mesma concentração. Na literatura, também foram encontrados valores menores no teor de umidade residual (HOFFMEISTER et al., 2012) e este fato pode ser devido à temperatura de saída do *spray-dryer* ter sido mais elevada, pois este é um fator que possui grande impacto sobre o nível de umidade do pó e, geralmente, um menor teor de umidade está associado a altas temperaturas de saída (GOULA; ADAMAPOULOS, 2005).

Em relação aos pós obtidos por liofilização, um maior teor de umidade foi encontrado e, da mesma forma, um menor teor de umidade residual foi verificado para os pós preparados a partir das nanocápsulas ($p < 0,05$), tendo em vista a maior proporção de sólidos na formulação. Abdelwahed e colaboradores (2006c) obtiveram resultados semelhantes na desidratação de nanocápsulas de PCL utilizando a glicose como adjuvante. Os valores mais altos quanto ao teor de umidade residual encontrados pelo emprego do método de liofilização provavelmente são decorrentes do uso de baixas temperaturas durante o processo e pelo fato de não ter sido realizada uma etapa de secagem secundária.

3.3 Estudo de estabilidade

As suspensões de nanocápsulas poliméricas e as nanoemulsões contendo tioconazol (NC_P-TIO e NE-TIO) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC_P-B e NE-B) foram avaliadas 30 dias após preparação em relação ao tamanho das partículas, índice de polidispersão e teor de fármaco. As formulações foram armazenadas ao abrigo da luz e não

apresentaram precipitação ou sedimentação neste intervalo de tempo. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 5.

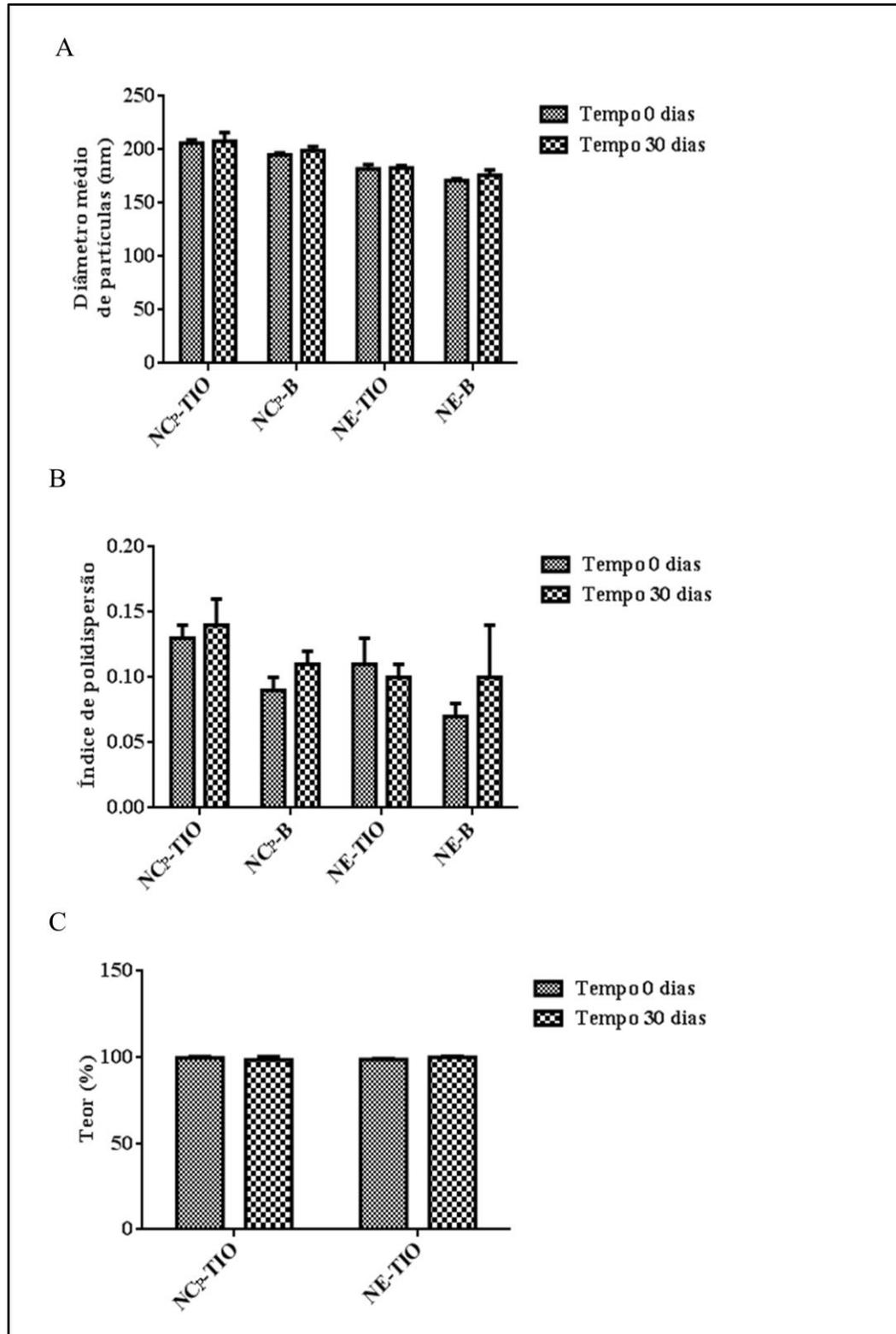


Figura 5 - Avaliação do tamanho de partículas (A), índice de polidispersão (B) e teor de fármaco (C) das suspensões de nanocápsulas (NC_p-TIO e NC-B) e nanoemulsões (NE-TIO e NE-B) após preparação e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

No que se refere ao diâmetro médio de partículas (Figura 5A) e ao índice de polidispersão (Figura 5B) as formulações mantiveram suas características iniciais, não havendo diferenças estatísticas entre os resultados obtidos após sua preparação e 30 dias de armazenamento ($p > 0,05$). Em relação ao teor de fármaco (Figura 5C), as nanocápsulas e nanoemulsões permaneceram estáveis durante 30 dias, não havendo diferenças em relação ao tempo inicial ($p > 0,05$), evidenciando que o tipo de estrutura não modificou o comportamento do fármaco durante este período.

A estabilidade dos produtos secos preparados a partir das nanocápsulas e nanoemulsões submetidas à secagem por aspersão (NC_P-TIO-S, NE-TIO-S, NC_P-B-S e NE-B-S) e à liofilização (NC_P-TIO-L, NE-TIO-L, NC_P-B-L e NE-B-L) foi monitorada após 30 dias da preparação, avaliando-se o tamanho de partícula após redispersão em água e o teor de fármaco. Os produtos secos foram armazenados em dessecador e não apresentaram mudança de cor neste intervalo de tempo. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Em relação ao diâmetro médio de partículas (Figura 6A) após o intervalo de 30 dias, todos os produtos secos apresentaram características semelhantes às formulações no tempo inicial. Isto pode ser observado através dos valores encontrados no índice de ressuspensão das formulações. Os resultados obtidos para os produtos secos por *spray-drying*, após 30 dias, foram: $Sf/Si = 0,6 \pm 0,04$; $0,8 \pm 0,01$; $1,1 \pm 0,03$ e $0,9 \pm 0,05$ para NC_P-TIO-S, NC_P-B-S, NE-TIO-S e NE-B-S respectivamente. Para os produtos secos obtidos por liofilização, os valores encontrados compreenderam: $Sf/Si = 0,8 \pm 0,02$; $1,0 \pm 0,06$; $1,0 \pm 0,01$ e $1,5 \pm 0,3$ para NC_P-TIO-L, NC_P-B-L, NE-TIO-L e NE-B-L, respectivamente. Pode-se verificar que as formulações permaneceram sem alterações significativas em relação ao índice de ressuspensão ($p > 0,05$) no intervalo de 30 dias. No entanto apenas a NE-TIO-S, diferiu significativamente em relação ao tempo inicial ($p < 0,05$).

No que se refere ao teor de fármaco (Figura 6B), os produtos secos preparados a partir das nanocápsulas por *spray-drying* (NC_P-TIO-S) e liofilização (NC_P-TIO-L), bem como o oriundo da nanoemulsão (NE-TIO-L) possibilitaram manter o teor de fármaco inicial. Porém, um decaimento de 29 % foi verificado para o pó preparado a partir da nanoemulsão e submetido à secagem por aspersão (NE-TIO-S), podendo esta perda de fármaco estar relacionada à instabilidade físico-química deste no sistema. Este resultado pode evidenciar a importância da parede polimérica em manter a concentração do fármaco no sistema quando as nanoestruturas foram submetidas à secagem envolvendo altas temperaturas. Estes dados mostram que a combinação tipo de sistema/temperatura do processo de desidratação influenciaram a estabilidade do tioconazol em função do tempo, sendo que a liofilização foi o

método de escolha no caso das nanoemulsões e, para os sistemas vesiculares (nanocápsulas), os dois métodos conduziram a resultados adequados, semelhantes às suspensões de origem.

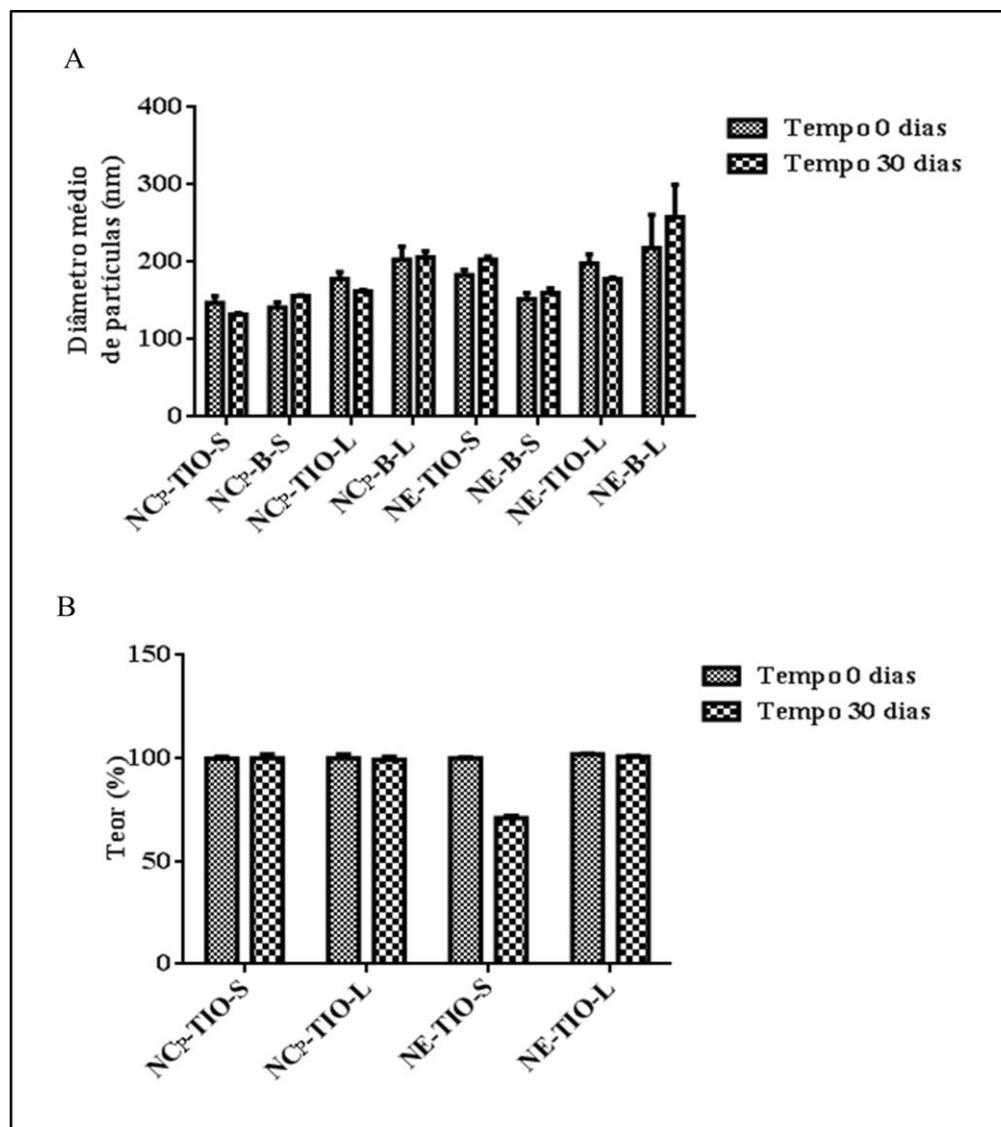


Figura 6 - Avaliação do tamanho de partículas (A) e teor de fármaco (B) dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC_P-TIO-S, NC_P-B-S, NC_P-TIO-L e NC_P-B-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S, NE-B-S, NE-TIO-L, NE-B-L) após preparação e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

3.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método de difusão em ágar frente à levedura de *Candida albicans* ATCC 10231, a fim de se verificar a ação do fármaco nos sistemas desenvolvidos, através da medida do halo de inibição. Uma solução do fármaco livre (não associado aos nanocarreadores – S-TIO) foi preparada em metanol (1,0 mg/mL)

para fins comparativos. Além destas, também foram avaliados os produtos secos para verificar se os diferentes princípios dos métodos de desidratação, um a quente (*spray-drying*) e outro a frio (liofilização), poderiam causar alterações na organização das nanoestruturas que pudessem levar a diferenças na atividade do fármaco frente a tal microrganismo. As formulações e a solução do fármaco foram diluídas/dispersas em água a fim de obter uma concentração de 2,0 µg/mL de tioconazol. Os resultados obtidos neste ensaio se encontram na figura 7.

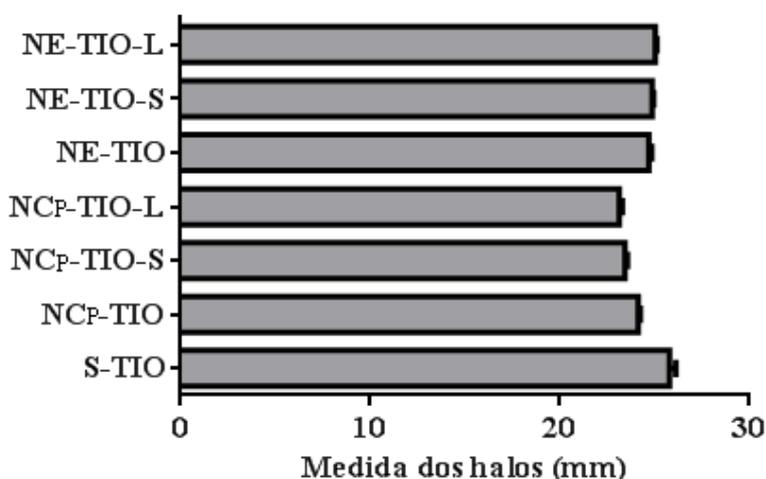


Figura 7 - Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) determinados na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC_P-TIO e NE-TIO, respectivamente); dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas (NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S e NE-TIO-L) contendo tioconazol e solução de tioconazol (S-TIO) (n = 6).

A partir dos resultados, halos de inibição na faixa de 23 a 26 mm foram obtidos, sendo que a solução de tioconazol (S-TIO) apresentou halo médio de inibição levemente superior às demais formulações ($25,79 \pm 0,32$ mm). Esta maior ação sobre a *C. albicans* pode estar relacionada à pronta disponibilidade do fármaco em difundir no meio. No entanto, o fármaco associado às suspensões de nanocápsulas (NC_P-TIO) e presente nos produtos secos obtidos por tais sistemas, tanto por *spray-drying* (NC_P-TIO-S) quanto por liofilização (NC_P-TIO-L), também apresentaram ação frente à levedura. No que se refere às nanoemulsões, comportamento semelhante foi verificado para a formulação líquida (NE-TIO) e os produtos secos (NE-TIO-L e NE-TIO-L). Cabe salientar que o encapsulamento do fármaco nas nanoestruturas manteve a sua atividade antifúngica e que os processos de desidratação, em que as suspensões de nanocápsulas e as nanoemulsões foram submetidas, não alteraram a sua

atividade. A fim de elucidar melhor os resultados e comparar a ação do fármaco antes e após o processo de desidratação, utilizou-se como referência a média dos halos de inibição das nanocápsulas ($24,15 \pm 0,10$ mm) e nanoemulsões ($24,71 \pm 0,15$ mm), correspondendo a 100 % de atividade (potência). A partir destes dados, se verificou que os produtos secos apresentaram $97,1 \pm 0,7$; $95,9 \pm 0,6$; $100,6 \pm 0,6$ e $101,3 \pm 0,7$ % de potência para NC_P-TIO-S, NC_P-TIO-L, NE-TIO-S e NE-TIO-L, respectivamente, demonstrando a manutenção de sua ação.

Adicionalmente, formulações sem fármaco (suspensão de nanocápsulas, nanoemulsão e os respectivos produtos secos) e a mistura de solventes (metanol e água) utilizada na preparação da solução foram, também, analisadas para conferir se poderia haver interferência dos excipientes no ensaio. Para estas amostras, não se verificou ação frente à levedura.

Attama e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica do tioconazol associado a um carreador lipídico (microemulsão) frente à *C. albicans* pelo método de difusão em ágar e os resultados demonstraram maior ação do fármaco nestas formulações em relação a uma solução de tioconazol em DMSO. Os autores atribuíram estes resultados a melhor permeabilidade do fármaco na parede da célula fúngica, tendo em vista a combinação de excipientes utilizados na formulação: diferentes concentrações de óleo de soja, tensoativos (Cremophor[®] S9) e co-tensoativos (Brij[®] 35). Verificou-se que a formulação constituída por 26, 40 e 34 %, respectivamente, dos componentes citados anteriormente, foi a mais efetiva. Cabe salientar que a utilização de substâncias lipídicas em formulações pode aumentar a atividade microbiológica de fármacos, por atuarem no rompimento da membrana das células do microrganismo (BERGSSON et al., 2001).

A atividade antifúngica de fármacos associados a nanocarreadores tem sido estudada. Das e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antifúngica de nanopartículas de Eudragit[®] RL100 contendo anfotericina-B, para via ocular, frente ao microrganismo *Fusarium solani*. As nanopartículas apresentaram equivalente atividade antifúngica em comparação com uma formulação controle do fármaco.

Uma dispersão em água, uma emulsão e nanopartículas de PLGA, todas contendo itraconazol, foram avaliadas em relação à atividade antifúngica frente ao *Aspergillus flavus*. A água e a emulsão apresentaram semelhante atividade antifúngica, entretanto, as nanopartículas de itraconazol apresentaram maior atividade frente ao microrganismo em comparação com as demais formulações, com zonas de inibição clara para além do ponto de aplicação (PATEL et al., 2010).

3.5 Avaliação da liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos produtos secos

A partir do exposto, o conjunto de resultados possibilitou escolher os produtos secos preparados a partir de nanocápsulas contendo tioconazol pelo método de secagem por aspersão e liofilização para este ensaio comparativo. O estudo da liberação *in vitro* do tioconazol foi realizado empregando membrana de diálise, a fim de comparar a influência do método de secagem no controle da liberação do fármaco. Os perfis de liberação *in vitro* do tioconazol para as amostras em estudo está representado na figura 8. Para a quantificação do tioconazol nos diferentes tempos, o método analítico foi validado e se mostrou específico (meio receptor não interferiu no doseamento do fármaco); linear na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL, a partir da construção de três curvas analíticas ($y = 48733x + 1997,1$; $r^2 = 1$), apresentando regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 88702,47 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e ausência de desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 1,09 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$); além de preciso (desvio padrão relativo = 1,68 e 1,63 % para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente).

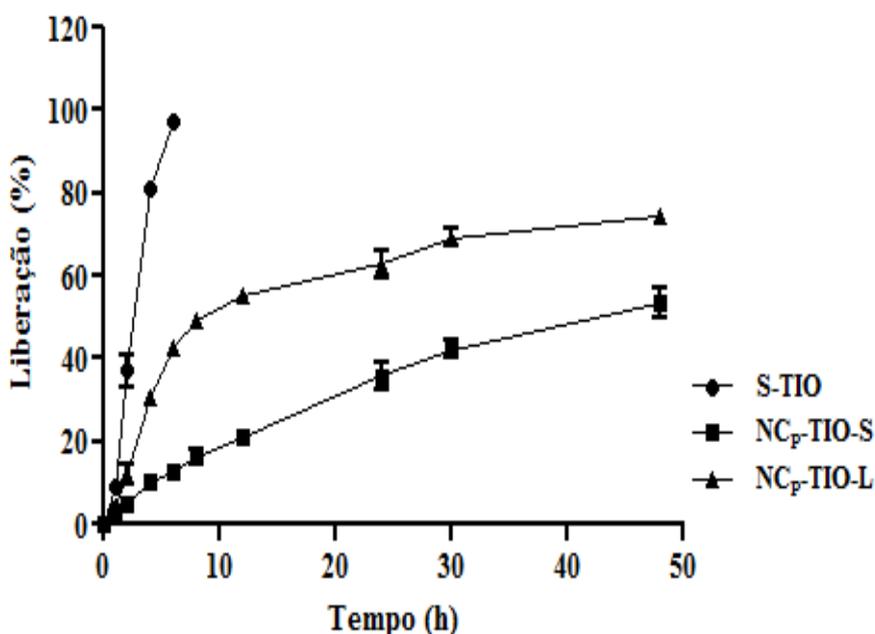


Figura 8 - Perfil de liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos produtos secos (NC_p-TIO-S, NC_p-TIO-L), após redispersão em água, e solução do fármaco (S-TIO).

Os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol por *spray-drying* (NC_p-TIO-S) apresentaram 53 % de liberação do fármaco em 48 horas. Em relação aos pós preparados a partir de nanocápsulas por liofilização (NC_p-TIO-L), uma maior liberação do fármaco foi verificada (74 % em 48 horas) (Figura 8). Comparando-se estes

resultados com uma solução do fármaco livre, uma difusão completa do fármaco foi alcançada após 6 horas, demonstrando que a associação do tioconazol às nanocápsulas foi capaz de promover controle da liberação do fármaco. Estudos na literatura corroboram com estes resultados em relação à liberação de fármacos lipofílicos a partir de suspensões de nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso (FONTANA et al., 2009; SANTOS et al., 2013) e também em produtos secos a partir de nanocápsulas (HOFFMEISTER et al., 2010).

Os modelos matemáticos utilizados para avaliar o perfil de liberação do tioconazol nas formulações foram: ordem zero, monoexponencial e biexponencial. De acordo com o maior coeficiente de correlação (r) e mais elevado critério de seleção do modelo (MSC), para a solução de tioconazol (S-TIO) o melhor ajuste foi o modelo de ordem zero ($k_1 = 17,3883 \pm 0,2206/h$, $r: 0,9821 \pm 0,0013$ e MSC: $2,9318 \pm 0,0706$), demonstrando uma difusão do fármaco com uma velocidade constante (independente da concentração) (COSTA; LOBO, 2001; SIEPMANN, SIEPMANN, 2008). Por outro lado, para todos os produtos secos contendo tioconazol, o melhor ajuste do modelo matemático foi biexponencial (Tabela 3) que, neste caso, representa uma liberação mais acentuada na fase inicial (*efeito burst*), seguida por uma constante de velocidade de liberação com fase sustentada (SIEPMANN, SIEPMANN, 2008).

Tabela 3 - Parâmetros de liberação calculados a partir da modelagem matemática para os produtos secos contendo nanocápsulas (NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L)

	NC _P -TIO-S	NC _P -TIO-L
Ordem zero		
k (1/h)	1,2868 ± 0,0747	2,1278 ± 0,0376
r	0,9804 ± 0,0033	0,8362 ± 0,0013
MSC	2,3439 ± 0,1630	0,2271 ± 0,0435
Monoexponencial		
k (1/h)	0,0180 ± 0,0015	0,0561 ± 0,0033
r	0,9955 ± 0,0025	0,9496 ± 0,0061
MSC	3,8422 ± 0,4247	1,5380 ± 0,0830
Biexponencial		
k1 (1/h)	0,0684 ± 0,0122	0,1898 ± 0,0098
k2 (1/h)	0,0115 ± 0,0023	0,0102 ± 0,0008
a (mg/mL)	0,2058 ± 0,0407	0,6078 ± 0,0259
b (mg/mL)	0,7885 ± 0,0407	0,4298 ± 0,0289
r	0,9985 ± 0,0013	0,9945 ± 0,0021
MSC	5,2159 ± 0,7736	3,7803 ± 0,4557
Leis das potências		
a	3,9045 ± 0,2888	16,3884 ± 0,7339
n	0,6851 ± 0,0176	0,4484 ± 0,0076
r	0,9970 ± 0,0012	0,9582 ± 0,0027
MSC	4,7358 ± 0,3718	2,0748 ± 0,0630

Os valores das constantes de velocidade relacionados à fase *burst* (k1) foram superiores aos obtidos na fase sustentada (k2) (Tabela 3). Em relação ao efeito *burst* ocasionado pelas formulações, pode ser verificada a contribuição deste nos valores das concentrações iniciais de fármaco liberado (a), que para os produtos secos foi de 0,20 mg/mL (NC_P-TIO-S) e 0,61 mg/mL (NC_P-TIO-L), enquanto que as concentrações em relação ao efeito sustentado (b) foram de 0,79 mg/mL (NC_P-TIO-S) e 0,43 mg/mL (NC_P-TIO-L). Estes valores demonstram que, provavelmente, para as nanocápsulas submetidas à secagem por *spray-drying* (NC_P-TIO-S), cerca de 79 % do fármaco estaria localizado no interior das nanopartículas e que 20 % estaria adsorvido mais superficialmente ou independentemente

livre da nanoestrutura. Apesar da liberação do fármaco a partir dos sistemas submetidos à liofilização (NC_P-TIO-L) ocorrer também em duas etapas, as quantidades liberadas, em cada fase, diferiram significativamente das formulações secas por aspensão, correspondendo, provavelmente, a cerca de 43 % de fármaco no interior das partículas e 61 % distribuído mais superficialmente ou independentemente livre no sistema. Através destes resultados, verifica-se que o tipo de método de desidratação influenciou a liberação *in vitro* do tioconazol, demonstrando que possa ter ocorrido uma re-estruturação do sistema, em função da provável fusão da PCL, na secagem por aspensão, resultando em diferente distribuição do fármaco nas partículas em relação às estruturas originais/liofilizadas. Hoffmeister e colaboradores (2012) avaliaram o perfil de liberação da melatonina em suspensões de nanocápsulas poliméricas e nos seus respectivos produtos secos por *spray-drying*, sendo que os produtos secos apresentaram maior controle na liberação do que as suspensões de nanocápsulas de origem.

Cabe salientar que não há relatos na literatura a respeito da liberação de produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas utilizando os sacos de diálise comparando os diferentes tipos de métodos de desidratação. No entanto, há o desenvolvimento de nanopartículas de poli(anidrido) preparadas pelo método de deslocamento do solvente que após foram submetidas aos processos de *spray-drying* e liofilização. Neste trabalho, foi avaliado o perfil de liberação dos sistemas, à temperatura de 37 ± 1 °C, sob agitação em rotação (REBOUÇAS et al., 2012). Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados neste trabalho em que os produtos secos obtidos por *spray-drying* apresentaram uma liberação mais lenta em comparação aos obtidos por liofilização. No presente trabalho, a liberação mais prolongada dos produtos secos preparados pela secagem por aspensão (NC_P-TIO-S) pode ser atribuída à provável maior quantidade de fármaco internalizada no núcleo das partículas (79 %). Não é possível descartar, também, algum tipo de influência estrutural referente ao processo de formação dos cristais de gelo entre às nanoestruturas que possa ter contribuído para o aumento da velocidade de liberação do fármaco.

Considerando o tempo de meio-vida de liberação do fármaco a partir dos produtos secos obtidos por *spray-drying*, na fase inicial foi de 10,13 h e na fase sustentada foi de 60,26 h, demonstrando, nesta última, maior controle de liberação. Por outro lado, os produtos secos obtidos por liofilização apresentaram valores mais baixos do que os determinados para NC_P-TIO-S na fase inicial ($t_{1/2} = 3,65$ h) ($p < 0,05$), demonstrando que a liberação do fármaco ocorreu em um menor tempo nas horas iniciais; em relação à fase sustentada; um aumento no tempo de meia-vida foi verificado para os pós preparados por liofilização ($t_{1/2} = 67,94$ h), no qual diferenças significativas não foram verificadas em relação aos pós preparados por

spray-drying ($p > 0,05$). A solução do fármaco livre (não associado às nanocápsulas – S-TIO) apresentou uma difusão significativamente mais rápida ($t_{1/2} = 2,90$ h) em comparação aos nanocarreadores, corroborando com a elevada eficiência de encapsulamento do tioconazol verificada.

Por fim, o mecanismo de liberação do fármaco, a partir dos produtos secos contendo as nanocápsulas, foi avaliado pela aplicação da lei das potências (Power Law). Este modelo estabelece limites de valores, conhecido como expoente de liberação (n), que avalia o tipo de mecanismo de liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos que apresentam uma geometria esférica, sendo denominados: (a) $n = 0,43$ indicando difusão Fickiana; (b) $0,43 < n < 0,85$ correspondente ao transporte anômalo e (c) $n \geq 0,85$ transporte de caso II (PEPPAS, 1985). Os valores obtidos foram de 0,68 e 0,45 para NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L, respectivamente, indicando um transporte anômalo, no qual a liberação do fármaco é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas seguido da sua difusão no meio. Apesar das velocidades das fases e das quantidades de fármaco liberadas em cada uma delas ter diferido de forma importante, tanto o melhor tipo de modelo (biexponencial) quanto o mecanismo de liberação do fármaco, através da lei das potências, foram semelhantes, independente do princípio do método de desidratação.

4 CONCLUSÃO

O propósito deste trabalho foi desenvolver produtos secos redispersíveis a partir da desidratação de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol, utilizando dois métodos: *spray-drying* (a quente) e liofilização (a frio). A análise de tamanho de partícula após a redispersão dos pós em água, realizada por espectroscopia de correlação de fótons demonstrou a manutenção do tamanho em comparação com as formulações originais. Na avaliação da atividade antifúngica, frente à levedura de *C. albicans*, pode-se verificar a eficácia do fármaco após nanoencapsulamento e desidratação (secagem por aspensão ou liofilização). Além disso, um maior controle da liberação do tioconazol foi verificado para os pós preparados a partir das nanocápsulas por *spray-drying*. Este fato é interessante visto que o controle da liberação é muito importante, pois pode promover um aumento na permanência do fármaco no local de aplicação, conseqüentemente, favorecendo uma maior eficácia terapêutica, além da administração mais segura e conveniente (menor número de doses aplicadas). Para o propósito deste estudo, a secagem por aspensão poderia ser o método de

escolha, visto que, além do maior controle da liberação do fármaco, apresenta vantagem de ser um método mais rápido e bem aceito industrialmente.

5 REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006a.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006b.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87-94, 2006c.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 74-82, 2006d.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

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

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.

AUVILLAIN, M.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S.T.P. Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 738-744, 1989.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R.; OURIQUE, A. F.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, p.195-208, 2012.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 3209-3212, 2001.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BURAPAPADH, K.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving in vitro dissolution and in vivo absorption of poorly water-soluble drug. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 250-261, 2012.

CERDEIRA, A. M.; MAZZOTTI, M.; GANDER, B. Formulation and drying of miconazole and itraconazole nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, p. 209-220, 2013.

CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS RELACIONADAS (COLACRO), 14., 2012, Florianópolis. **Validation of analytical method and assessment stability to analysis of tioconazole in polymeric nanocapsules**. Florianópolis: COLACRO XIV, 2012. 243 p.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.

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.

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

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.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 1966-1972, 2008.

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

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

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.

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

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, p. 1-13, 2012.

HOVEN, J. M.; METSELAAR, J. M.; STORM, G.; BEIJNEN, J. H.; NUIJEN, B. Cyclodextrin as membrane protectant in spray-drying and freeze-drying of PEGylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, p. 209- 216, 2012.

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

ISLAM, M. I. U.; LANGRISH, T. A. G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, v. 43, p. 46-56, 2010.

JONES, R. N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIN, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (Vagistat-1 6.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.17, p. 45-51, 1993.

KAWAKAMI, R.; SUMITANI, C., YOSHIHASHI, Y.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Investigation of the dynamic process during spray-drying to improve aerodynamic performance of inhalation particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 250-259, 2010.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, p.254-259, 2012.

KHO, K.; CHEOW, W. S.; LIE, R. H.; HADINOTO, K. Aqueous re-dispersibility of spray-dried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. **Powder Technology**, v. 203, p. 432-439. 2010.

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.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304-310, 2010.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

- 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.
- MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2059-2067, 2012.
- MISHRA, B.; BHAVESH, P. B.; TIWARI S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications 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, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343-347, 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.
- NAKAGAWA, K.; SURASSMO, S.; MIN, S. G.; CHOI, M. J. Dispersibility of freeze-dried poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 177-188, 2011.
- 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.
- OVERCASHIER, D. E.; PATAPOFF, T. W.; HSU, C. C. Lyophilization of protein formulations in vials: investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 688-695, 1999.
- PATEL, N. R.; DAMANN, K.; 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.
- PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, p. 110-111, 1985.

REBOUÇAS, J. S.; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; ESPARZA, I.; POZO, V.; SANZ, M. L.; FERRER, M.; GAMAZO, C. Development of poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins: the influence of preparation method on the immunogenic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 241-249, 2012.

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.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.

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. 26, n. 5, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 505-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

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.

STUBB, S.; HEIKKILÄ, H.; REITAMO, S.; FÖRSTRÖM, L. Contact allergy to tioconazole. **Contact Dermatitis**, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

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

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p. 124-135, 2007.

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

VAN WINDEN, E. C. A.; TALSMA, H.; CROMMELIN, D. J. A. Thermal analysis of freeze dried liposome-carbohydrate mixtures with modulated differential scanning calorimetry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 231-237, 1998.

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

WESSMAN, P.; EDWARDS, K.; MAHLIN, D. Structural effects caused by spray- and freeze-drying of liposomes and bilayer disks. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2032-2048, 2010.

CAPÍTULO 2: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão: estudo comparativo entre adjuvantes de secagem.

CAPÍTULO 2: Obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão: estudo comparativo entre adjuvantes de secagem.

2.1 Apresentação

No presente estudo, o método de secagem por aspersão foi selecionado devido ao fato de as partículas obtidas através do mesmo apresentarem-se mais promissoras no controle de liberação do tioconazol (Capítulo 1), além de ser uma técnica bem aceita industrialmente. Neste sentido, buscou-se avaliar a influência de dois adjuvantes muito empregados na desidratação de sistemas nanoestruturados, a trealose e a lactose, carboidratos com alta solubilidade, capazes de originar pós com adequada capacidade de ressuspensão (ÓGÁIN et al., 2011; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, utilizando a técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*). O Eudragit[®] RS 100, um polímero catiônico, foi selecionado devido a sua característica de bioadesividade (PIGNATELLO et al., 2002), propriedade importante visando a uma aplicação tópica antifúngica.

Com isto, a principal abordagem foi avaliar e comparar os dois diferentes tipos de adjuvantes nas características físico-químicas, avaliação microbiológica e perfil de liberação do fármaco dos produtos secos contendo tioconazol.

Resumo

A secagem de sistemas nanoestruturados se apresenta como uma alternativa interessante na área farmacêutica, com o objetivo de tentar minimizar problemas de instabilidade e de futura contaminação microbiana. O objetivo deste trabalho foi desenvolver produtos sólidos a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, um antifúngico de amplo espectro de ação. A lactose (NC_E-TIO-S_{LAC}) ou a trealose (NC_E-TIO-S_{TREA}) (10 %, m/v) foram adicionadas às suspensões nanoparticuladas e, após, submetidas à secagem por aspersão (*spray-drying*). O rendimento ponderal dos produtos secos foi de 60 – 70 % e 50 – 60 % utilizando como adjuvante de secagem a lactose e a trealose, respectivamente. Após a redispersão dos pós em água, a análise do tamanho de partículas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons e os índices de ressuspensão obtidos foram de 1,2 e 1,1 para os produtos secos preparados com lactose e trealose, respectivamente. Ambas as formulações, após preparação, apresentaram teores de tioconazol próximos a 100 %. No entanto, após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, verificou-se um decaimento do teor de fármaco (64 %) nos produtos secos preparados com lactose. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de partículas arredondadas, esféricas e algumas com superfície irregular (NC_E-TIO-S_{LAC}); partículas arredondadas, esféricas e com superfície mais lisa foram verificadas para os pós preparados com trealose (NC_E-TIO-S_{TREA}). A atividade antifúngica dos pós frente à levedura de *Candida albicans* foi avaliada e os resultados obtidos demonstraram a manutenção dos halos de inibição quando comparados aos obtidos para as suspensões originais. Em relação ao perfil de liberação, ambos os produtos secos foram capazes de controlar a liberação do tioconazol e diferenças não foram verificadas em relação ao tipo de adjuvante utilizado no processo de secagem. Através dos resultados, verificou-se a viabilidade tecnológica na obtenção de produtos secos redispersíveis a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, por *spray-drying*, utilizando a lactose ou a trealose como adjuvantes de secagem, com características semelhantes às suspensões coloidais aquosas, servindo com uma alternativa promissora para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas inovadoras.

Palavras chave: Eudragit[®] RS100; lactose; nanocápsulas poliméricas; produtos secos; *spray-drying*; tioconazol; trealose.

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses ou micoses superficiais são infecções causadas por fungos queratinofílicos denominados de dermatófitos, além de algumas leveduras como *Candida* sp. (RUBIO et al., 1999; DE DIEGO, 2011). Dentre os fármacos disponíveis para o tratamento deste tipo de infecção se encontra o tioconazol, um fármaco pertencente à família dos imidazólicos (GUPTA; COOPER, 2008), com um amplo espectro de atividade antifúngica (SWEETMAN, 2006). Seu mecanismo de ação se relaciona à inibição da biossíntese dos esteróis (efeito fungistático), causando um dano direto à membrana celular desses microrganismos (efeito fungicida) (FROMTLING, 1988). Além disso, apresenta ação frente a outros microrganismos de importância clínica, como clamídias; tricomonas e bactérias gram-positivas (MUÑOZ et al., 2010). Tendo em vista o seu amplo espectro de ação, o tioconazol é indicado no tratamento tópico de micoses superficiais, principalmente as infecções fúngicas que acometem a pele, as unhas (WELSH; CABRERA; WELSH, 2010) e em candidíase vaginal (NYIRJESY, 2008). No entanto, por ser um fármaco altamente lipofílico e com baixa absorção cutânea, seu emprego requer a utilização de altas concentrações em preparações farmacêuticas (FROMTLING, 1988; MUÑOZ et al., 2010), acarretando em reações adversas como irritação local, coceira, eritema e prurido (SWEETMAN, 2006), além de alergias de contato (HEIKKILA; STUBB; REITAMO, 1996).

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos como os nanocarreadores, tem apresentado vantagens, como a melhora das propriedades físico-químicas de substâncias, proporcionando uma maior e melhor distribuição do ativo no local de ação e o direcionamento deste ao seu sítio específico (SCHAFFAZICK et al., 2003; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Estes sistemas atuam de forma diferenciada em relação à liberação do fármaco e dentre eles, as nanocápsulas poliméricas se destacam, sendo sistemas vesiculares, contendo um núcleo envolto por uma parede polimérica, podendo proporcionar uma liberação controlada do fármaco (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010) dependente da presença/natureza do polímero e do seu mecanismo de liberação, através do relaxamento das cadeias poliméricas, dissolução ou erosão da matriz polimérica, seguido da difusão do fármaco. A viscosidade do núcleo, de natureza oleosa, também pode influenciar a cinética de liberação do fármaco (CRUZ et al., 2006). No que se refere à aplicação tópica, as nanopartículas poliméricas são capazes de modular a absorção transdérmica de fármacos, modificando, assim, a sua atividade molecular e/ou sua partição e difusão (CEVC, 2004); conferem a possibilidade de aumentar o tempo de permanência e adesividade dos produtos

após aplicação (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; WEISS-ANGELI et al., 2008) e de promover uma liberação mais homogênea do fármaco em virtude da grande área superficial que tais sistemas apresentam. Além disso, proporcionam uma ação de forma mais prolongada/sustentada (FONTANA et al., 2009; MARCHIORI et al., 2010).

Apesar dos benefícios encontrados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, estas são encontradas sob a forma de suspensão coloidal aquosa e podem apresentar problemas de estabilidade frente ao armazenamento, como a hidrólise do polímero, podendo levar à perda da substância ativa encapsulada, agregação das partículas e sedimentação, além de contaminação microbiana (MAGENHEIM; BENITA, 1991; BECK et al., 2012). Assim, a conversão das suspensões coloidais em formas farmacêuticas sólidas, através de métodos como a secagem por aspersão (MÜLLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012), a liofilização (AUVILLAIN et al., 1989; DE CHASTEIGNER et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003; ABDELWAHED et al., 2006) e a granulação por via-úmida (FRIEDRICH et al., 2010) tem sido estudada como alternativa para superar os fenômenos de instabilidade físico-química.

A secagem por aspersão, também conhecida por *spray-drying*, foi utilizada primeiramente como método de secagem de nanocápsulas poliméricas por Müller e colaboradores (2000). Desde então, muitos estudos foram desenvolvidos para a obtenção de produtos sólidos contendo tais sistemas (RAFFIN et al., 2003; BECK; POHLMANN; GUTERRES, 2004; SCHAFFAZICK et al., 2006; BECK, et al., 2007; DOMINGUES et al., 2008; KHO et al., 2010; HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012). É uma técnica que apresenta como vantagens a rapidez na preparação, maior facilidade de transposição de escala, a possibilidade de aplicação para substâncias termosensíveis (RÉ, 2006; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009), além de tratar-se de um processo de baixo custo, com possibilidade de modular as características físico-químicas do pó e a obtenção de produtos secos com baixos teores de umidade, conseqüentemente, com um longo período de vida útil em prateleira (BECK et al., 2012).

Para a obtenção de formulações com uma boa redispersão, é importante a utilização de adjuvantes que permitam a proteção das nanopartículas durante o processo de pulverização, principalmente para atuar contra as forças de cisalhamento, as temperaturas elevadas durante o processo e, também, para evitar a aderência das partículas nas paredes do equipamento (WENDORF; RADKE; BLANCH, 2004; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; JENSEN et al., 2010). Neste caso, os carboidratos são muito empregados por serem solúveis

em água, apresentarem um bom perfil de segurança para a integridade das partículas, sendo uma boa escolha para a obtenção de pós redispersíveis (TOMODA et al., 2008; ÓGÁIN et al., 2011).

A partir do exposto, este trabalho teve como objetivo a obtenção de produtos secos redispersíveis preparados a partir de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 contendo tioconazol, através da secagem por aspersão, utilizando dois adjuvantes de secagem: a lactose ou a trealose. Foram avaliadas, além das propriedades físico-químicas, a estabilidade frente ao armazenamento, a atividade antifúngica e o perfil de liberação do fármaco a partir destes sistemas. Cabe salientar que não foram encontrados dados na literatura a respeito da secagem por aspersão de nanocápsulas poliméricas utilizando a trealose como adjuvante de secagem.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Tioconazol foi obtido comercialmente pela Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). Eudragit[®] RS100 (Röhm GmbH, Pharma Polymers, Alemanha) foi gentilmente fornecido pela Almapal (São Paulo, Brasil). Monooleato de sorbitano (Span[®] 80) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Polissorbatato 80 (Tween[®] 80) foi obtido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCM) e lactose monoidratada foram adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brasil). Trealose (Hayashibara, Japão) foi gentilmente fornecida pela Tovani Benzaquen Repr. Ltda (São Paulo, Brasil). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Tedia (São Paulo, Brasil). Os demais solventes, meios de cultura e reagentes empregados apresentaram grau analítico/farmacêutico.

2.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (NC_E-TIO) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). A fase orgânica, constituída de tioconazol (0,05 g), monooleato de sorbitano (0,385 g), triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (0,8 g), o polímero Eudragit[®] RS100 (0,5 g) e acetona (134 mL), foi mantida sob agitação magnética durante 60 minutos, a uma temperatura de 40 °C para solubilização total dos componentes da formulação.

Após, foi vertida em uma fase aquosa constituída de polissorbato 80 (0,385 g) e água ultrapura (267 mL) e mantida sob agitação magnética durante 10 minutos. Logo após, a formulação foi concentrada em evaporador rotatório (40 °C) para eliminação do solvente orgânico e obtenção do volume final de 50 mL (1,0 mg/mL de tioconazol). Nanocápsulas poliméricas sem o fármaco (NC_E-B) também foram preparadas e avaliadas. Todas as formulações foram preparadas em triplicata, acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas à temperatura ambiente para posterior caracterização.

2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

O diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) das suspensões foram determinados (n = 3) por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK), a 25 ± 2 °C. Para tal, uma alíquota das amostras foi diluída em água purificada na proporção 1:500 (v/v). A determinação do pH foi realizada diretamente nas suspensões, utilizando-se potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

A determinação de teor de tioconazol foi realizada por cromatografia líquida (CL), de acordo com metodologia previamente validada e os parâmetros avaliados compreenderam especificidade, linearidade e precisão. O instrumento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu, Kyoto, Japão, equipado com uma bomba modelo LC-10AD, detector SPD-10A e sistema controlador SCL-10A. As análises foram realizadas de acordo com as seguintes condições experimentais: coluna C₁₈ Gemini[®] (150 mm x 4,60mm, 5 µm) e pré-coluna C₁₈ Phenomenex Security Guard; fase móvel composta de metanol:água (80:20, v/v) com ajuste de pH da água para 11,0 com hidróxido de amônia; fluxo de 1,0 mL/min.; volume de injeção de 20 µL e detecção em 219 nm, com o tempo de retenção do tioconazol em 7,2 minutos. A especificidade do método foi realizada a partir das suspensões de nanocápsulas sem fármaco (NC_E-B) e pela análise da pureza do pico cromatográfico. Para tal, utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão) equipado com detector de arranjo de diodos (SPD-M20A PDA), uma bomba modelo LC-20AT e sistema controlador CBM-20A.

Para a extração do fármaco, uma alíquota das suspensões (400 µL) foi diluída em metanol. A solução foi sonicada por 40 minutos em ultrassom e após filtrada em filtro quantitativo. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo.

A eficiência de encapsulamento (EE%) foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação (Amicon[®] 10.000 MW, Millipore) a uma velocidade rotacional de 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. A concentração de tioconazol livre foi determinada por CL.

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

2.4 Preparação dos produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas por *spray-drying*

Para a secagem das suspensões coloidais aquosas empregou-se a lactose ou a trealose como adjuvantes de secagem, ambos na concentração de 10 % (m/v). Os produtos secos foram preparados pela adição dos adjuvantes, individualmente, às suspensões contendo tioconazol (NC_E-TIO), mantendo-se a mistura sob agitação magnética durante 20 minutos. Após, as amostras foram submetidas à secagem em *spray-dryer* (MSD 1.0, Labmaq, São Paulo, Brasil) e as condições experimentais utilizadas compreenderam: temperatura de entrada do ar de 120 ± 5°C, fluxo de alimentação de 0,22 L/h e diâmetro do bico do atomizador de 0,7 mm. Os pós foram denominados de NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA} (produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas de tioconazol utilizando lactose e trealose como adjuvantes de secagem, respectivamente). Adicionalmente, produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas sem o fármaco (NC_E-B-S_{LAC} e NC_E-B-S_{TREA}) e dispersões de lactose (S_{LAC}) ou trealose (S_{TREA}) em água (10 %, m/v) foram, também, preparados e avaliados. Os pós foram preparados em triplicata, acondicionados em frascos de vidro e armazenados em dessecador para posterior caracterização.

2.5 Caracterização dos produtos secos

2.5.1 Rendimento ponderal

O rendimento do processo de secagem (%) foi calculado pela razão entre o peso do pó obtido no final do processo (experimentalmente) e a soma dos pesos de todos os componentes sólidos empregados em cada formulação, descrito conforme a equação 2:

$$(2) \quad R\% = \left[\frac{\text{Peso do pó obtido experimentalmente}}{\text{Peso total das matérias-primas}} \right] \times 100$$

2.5.2 Determinação do teor de fármaco

Para a determinação do teor de tioconazol nos produtos secos, a extração do fármaco foi realizada da seguinte forma: as amostras foram pesadas e dispersas em metanol (20 mL), mantidas sob agitação durante 15 minutos e filtradas em filtro quantitativo. Uma alíquota dessa dispersão foi retirada e diluída novamente em metanol, a fim de obter uma concentração final de 20 µg/mL de tioconazol. Após, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm e analisadas por CL, de acordo com as condições experimentais descritas no item 2.3. O método foi previamente validado (capítulo 1, item 2.4.4.1.). A especificidade do método foi realizada pela análise dos produtos secos sem fármaco (NC_E-B-S_{LAC} e NC_E-B-S_{TREA}), submetidos à mesma condição de extração empregada para os pós contendo tioconazol (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}), bem como pela análise da pureza do pico específico.

2.5.3 Avaliação da distribuição de tamanho de partículas

O volume de distribuição de tamanho de partículas dos produtos secos foi determinado utilizando difração a laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, UK), por via-úmida. O perfil de desaglomeração dos pós foi avaliado após sua dispersão em água, em intervalos de tempo de 0, 5, 15, 30 e 60 minutos. Estas análises foram realizadas na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

2.5.4 Determinação do tamanho de partículas após redispersão dos pós em água

O tamanho médio de partículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons, em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), à temperatura de 25 ± 2 °C. Os produtos secos foram primeiramente pesados e, após, dispersos em água ultrapura, a fim de se obter uma concentração final de 1,0 mg/mL de tioconazol, de acordo com a suspensão original. Cada amostra foi submetida à agitação magnética por 5 minutos e, após, uma alíquota foi retirada e diluída em água purificada na proporção 1:500 (v/v), seguida de filtração em membrana hidrofílica (0,45 μ m). O índice de ressuspensão das partículas, que representa a recuperação do tamanho médio de partículas em relação às formulações de origem, também foi calculado. Sua fórmula é representada através da relação entre o tamanho das partículas dos pós após a redispersão em água (tamanho final) pelo tamanho das partículas das formulações originais (tamanho inicial), conforme a equação 3. Quanto mais próximo de 1, maior é a recuperação do tamanho médio de partículas.

$$(3) \quad \text{Índice de ressuspensão} = S_f/S_i$$

Onde, S_f é o diâmetro médio de partículas dos produtos secos após redispersão em água e S_i é o diâmetro médio de partículas das formulações de origem.

2.5.5 Determinação do teor de água

O conteúdo de água dos produtos secos (%) foi determinado pelo método de Karl Fischer (Karl Fischer Metrohm 787 e agitador Ti Stand 703, São Paulo, Brasil), empregando-se quantidades de 40 a 50 mg dos pós para a titulação (F. Bras. V, 2010).

2.5.6 Análise morfológica dos pós

As amostras foram metalizadas com ouro e submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (Jeol Scanning Microscope, JSM-6063, Tóquio, Japão – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSM), empregando uma voltagem de 20 kV.

2.6 Estudo de estabilidade

Para o estudo, as suspensões de nanocápsulas e os produtos secos foram armazenados à temperatura ambiente e avaliados após 30 dias. Foram monitorados o teor, o diâmetro médio de partículas e, para as suspensões, adicionalmente, o índice de polidispersão.

2.7 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica das formulações foi realizada pelo método de difusão em ágar com pocinhos (F. Bras. V, 2010), frente à levedura de *Candida albicans* ATCC 10231, mantida em ágar Sabouraud-dextrose 4 % (SAD), por 48 horas, a temperatura de 25 ± 2 °C (tubo inclinado). O inóculo utilizado foi a 1% (v/v), após o preparo da suspensão do microrganismo em solução salina estéril, a uma concentração de 25 ± 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).

Uma alíquota das amostras (suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol – NC_E-TIO; produtos secos obtidos a partir de suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol – NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}, e solução de tioconazol em metanol – S-TIO) foi diluída em água purificada, a fim de obter uma concentração final de 2,0 µg/mL de tioconazol. Os produtos secos foram previamente pesados e redispersos em água purificada. As amostras sem fármaco (suspensão de nanocápsulas brancas – NC_E-B, produtos secos obtidos a partir destas – NC_E-B-S_{LAC} e NC_E-B-S_{TREA}, e solventes utilizados na preparação da solução) foram, também, avaliadas e diluídas na mesma proporção que as amostras contendo tioconazol.

Para cada amostra, grupos de seis placas de Petri foram utilizados, as quais continham 20 mL de meio SAD como camada base e 5 mL de inóculo. Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram colocadas, individualmente, em cada orifício (9,5 mm de diâmetro). As placas foram incubadas em estufa, a temperatura de 35 ± 5 °C, por 24 horas, e após este período, o diâmetro dos halos de inibição foi determinado (mm) com o auxílio de paquímetro digital (Paquímetro Eletrônico Digital Starrett, 727).

2.8 Avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos

A avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos (n = 3) foi estudada pela técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da,

Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA), conduzida em condições *sink*, utilizando como meio de liberação água:etanol (70:30, v/v). Para o ensaio, os produtos secos foram previamente pesados e redispersos em 5 mL de água purificada, a fim de obter uma concentração inicial de 1,0 mg/mL de tioconazol. Para comparação, uma solução etanólica contendo o fármaco livre (1,0 mg/mL) foi avaliada. Os sacos de diálise contendo 1,0 mL das amostras em estudo foram colocados em béqueres contendo 200 mL de meio de liberação, mantidos sob agitação magnética, à temperatura de 35 °C. Alíquotas de 1,0 mL de meio foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, repondo-se o mesmo volume de meio fresco, e filtradas em membrana de 0,45 µm. A concentração de tioconazol liberada em cada tempo foi determinada por CL, de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 2.3 (capítulo 1).

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das formulações foi analisado pela modelagem matemática de modelos dependentes (ordem zero, monoexponencial, biexponencial e Lei das Potências, conforme descrito no capítulo 1, item 2.7), empregando o programa MicroMath Scientist® for Windows™. A seleção do modelo que melhor descreveu os perfis de liberação foi baseada no melhor coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste do gráfico.

2.9 Análise estatística

Todas as formulações foram preparadas e analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A Análise de Variância (ANOVA) foi empregada para comparação dos dados experimentais, seguida do teste Tukey, a um nível de significância de 5 %, empregando-se o software SigmaStat (Versão 3.0.1.0, Jandel Scientific, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

As nanocápsulas, após a preparação, apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, com aspecto levemente branco leitoso e reflexo azulado (efeito *Tyndall*). Esta característica se deve ao tamanho nanométrico e ao movimento Browniano das partículas em suspensão (MAGENHEIM e BENITA, 1991; MORA-HUERTAS; FESSI;

ELAISSARI, 2010). Os resultados obtidos na caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e das formulações sem fármaco estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1 mg/mL) (NC_E-TIO) e suas respectivas formulações sem fármaco (NC_E-B), (n = 3, média ± s)

Formulação	pH	Tamanho médio de partículas (nm)	PDI*	Teor (%)
NC _E -TIO	5,30 ± 0,02	116 ± 04	0,16 ± 0,02	100,61 ± 0,52
NC _E -B	4,83 ± 0,02	110 ± 03	0,15 ± 0,01	-

*PDI: índice de polidispersão.

As nanocápsulas apresentaram tamanho nanométrico (110-116 nm) e índice de polidispersão inferior a 0,20. Estes resultados indicam adequada homogeneidade dos sistemas e estão de acordo com outros encontrados na literatura na preparação de nanocápsulas poliméricas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (DOMINGUES et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2006; SANTOS et al., 2013). Diferenças significativas não foram observadas entre as suspensões de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_E-TIO) e as nanocápsulas sem fármaco (NC_E-B) (p < 0,05), demonstrando que a presença do fármaco não influenciou o diâmetro médio de partículas e a distribuição de tamanho. Quanto ao pH, ambas as nanocápsulas apresentaram valores de pH ácido (4,8 - 5,3) devido às características dos componentes presentes nas formulações, corroborando com outras suspensões de nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] RS100 (DOMINGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2013). A presença do fármaco alterou significativamente (p < 0,05) o valor do pH das suspensões de nanocápsulas (Tabela 1). Em relação ao teor de fármaco, as nanocápsulas apresentaram conteúdo semelhante ao valor teórico (1,0 mg/mL) e elevada eficiência de encapsulamento (85,7 ± 1,6 %). Este resultado pode ser atribuído à afinidade do fármaco lipofílico com o polímero/óleo. Diferentes eficiências de encapsulamento têm sido reportadas na literatura mediante o desenvolvimento de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100, preparadas com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico como núcleo, de acordo com o fármaco incorporado (45 % para melatonina, SCHAFFAZICK et al., 2006; > 99,9 % para clotrimazol, SANTOS et al., 2013).

Cabe salientar que para a quantificação do fármaco nas suspensões de nanocápsulas, o método analítico foi previamente validado e se apresentou específico (ausência de picos no cromatograma das soluções obtido com a suspensão de nanocápsulas branca e índice de pureza de pico = 1,000); linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL e preciso (DPR = 1,69 % para repetibilidade).

3.2 Caracterização físico-química dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanocápsulas, após preparação, foram submetidas à secagem por aspersão (*spray-drying*) utilizando a lactose ou a trealose como adjuvantes de secagem, na proporção de 10 % (m/v). Os produtos secos apresentaram coloração branca, característica das suspensões de origem e dos adjuvantes de secagem e ausência de odor. A lactose (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; KHO et al., 2010; MARCHIORI et al., 2012) e a trealose (TOMODA et al., 2008; JENSEN et al., 2010; KATATA et al., 2012) são açúcares classificados como dissacarídeos e possuem elevada solubilidade em água, conseqüentemente, com maior capacidade de redispersão aquosa, o que é importante para a permanência das características iniciais das formulações originais. Além disso, ambos os adjuvantes apresentam altas temperaturas de transição vítrea (lactose: ~104 °C, ISLAM; LANGRISH, 2010; trealose: ~117 °C, BHARDWAJ; SURYANARAYANAN, 2012), contribuindo de forma significativa para as propriedades de estabilização das formulações (CROWE; REID; CROWE, 1996; BHARDWAJ; SURYANARAYANAN, 2012; PILCER; WAUTHOZ; AMIGHI, 2012). No estado vítreo, durante o processo de secagem, as alterações estruturais dos adjuvantes são significativamente retardadas e apenas pequenos movimentos moleculares ocorrem, como vibrações e movimentos de rotação das cadeias laterais (LEE, 2002).

Na tabela 2 estão apresentadas as características físico-químicas dos produtos secos desenvolvidos neste trabalho.

Tabela 2 - Caracterização físico-química dos produtos secos obtidos, por *spray-drying*, a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e como adjuvantes de secagem a lactose (NC_E-TIO-S_{LAC}) ou a trealose (NC_E-TIO-S_{TREA}), além das amostras sem fármaco (NC_E-B-S_{LAC} e NC_E-B-S_{TREA}), (n = 3, média ± s)

Formulação	Rendimento (%)	Teor (%)
NC _E -TIO-S _{LAC}	69 ± 01	99,81 ± 0,11
NC _E -B-S _{LAC}	64 ± 02	-
NC _E -TIO-S _{TREA}	54 ± 09	101,13 ± 0,18
NC _E -B-S _{TREA}	57 ± 01	-

O rendimento do processo de secagem foi de 64 a 69 % e 54 a 57 % para os pós preparados com lactose e trealose, respectivamente. Na literatura, há relatos da secagem por aspersão de nanocápsulas poliméricas utilizando a lactose como adjuvante de secagem e os valores referentes ao rendimento foram inferiores aos encontrados neste trabalho (HOFFMEISTER et al. 2012; MARCHIORI et al., 2012). No que se refere à utilização de trealose como adjuvante de secagem de nanopartículas de PLGA, os valores de rendimento foram de 30 – 50 % (JENSEN et al., 2010), um pouco inferiores aos valores encontrados neste trabalho. Quanto ao rendimento, os pós secos obtidos da secagem por aspersão de uma solução de lactose (S_{LAC}) e de trealose (S_{TREA}), apresentaram valores de 54 e 22 %, respectivamente. Diferenças significativas não foram observadas entre o adjuvante lactose e suas respectivas formulações, (p > 0,05), enquanto que houve diferenças significativas entre o adjuvante trealose e suas respectivas formulações (p < 0,05). É importante mencionar que o menor rendimento obtido para os pós preparados com trealose (NC_E-TIO-S_{TREA} e NC_E-B-S_{TREA}) em comparação aos produtos secos obtidos com lactose (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-B-S_{LAC}) pode ser atribuído às condições da temperatura de entrada e de saída no qual ocorreu o processo de secagem. Segundo Maury e colaboradores (2005) que estudaram a secagem por aspersão da trealose em diferentes métodos, a diferença entre a temperatura de entrada e de saída no equipamento não deve ser maior do que 10 °C, caso contrário, pode exceder a deposição de partículas nas paredes interiores do *spray-dryer*, dificultando a sua coleta. Segundo os autores, outros parâmetros relacionados ao processo de secagem (fluxo de alimentação da amostra, pressão do sistema, fluxo de ar e vazão do ar) não influenciaram no rendimento da trealose.

Para a determinação do teor de fármaco nos produtos secos, o método analítico foi validado (Apêndice B). O método mostrou-se específico (ausência de interferência dos excipientes no pico cromatográfico do fármaco e índice de pureza de pico = 1,000); linear (5 a 50 $\mu\text{g/mL}$) e preciso (DPR = 0,49 % para repetibilidade).

O teor de tioconazol nos produtos secos (Tabela 2), após a preparação, foi próximo ao valor teórico (7,02 mg/g), demonstrando que não houve degradação ou perda seletiva do fármaco durante o processo de secagem.

A distribuição de tamanho de partículas foi avaliada por difração a laser através do perfil de desaglomeração dos produtos secos após dispersão em água, a partir do tempo inicial (tempo zero) até 60 minutos (Figura 1). O perfil de distribuição de tamanho dos pós foi comparado com o da suspensão de nanocápsulas ($\text{NC}_E\text{-TIO}$), a qual apresenta um pico unimodal. Após a redispersão, os produtos secos preparados com lactose ($\text{NC}_E\text{-TIO-S}_{\text{LAC}}$) apresentaram dois picos, um com uma pequena população nanométrica e com partículas de tamanho micrométrico (abaixo de 5 μm), e um pico com maior número de partículas micrométricas. Após 60 minutos, o perfil de redispersão não apresentou diferenças importantes em relação à população nanométrica e o maior pico de população micrométrica apresentou uma pequena redução no tamanho das partículas (Figura 1A). Apesar de existir uma população nanométrica no produto seco contendo a lactose como adjuvante de secagem, neste tipo de análise, este pó não apresentou um perfil semelhante à suspensão de nanocápsulas original.

Resultados diferenciados foram verificados para os pós preparados com trealose como adjuvante de secagem ($\text{NC}_E\text{-TIO-S}_{\text{TREA}}$). Após redispersão, verificou-se a presença de dois picos, ambos com população nanométrica, no qual o maior deles apresentou um perfil de distribuição de tamanho semelhante ao perfil da suspensão original e, após 60 minutos, o perfil permaneceu o mesmo (Figura 1B), indicando que este sistema pode ser totalmente redispersível para alcançar tamanhos nanométricos, fato que pode ser evidenciado por análise através de difração a laser.

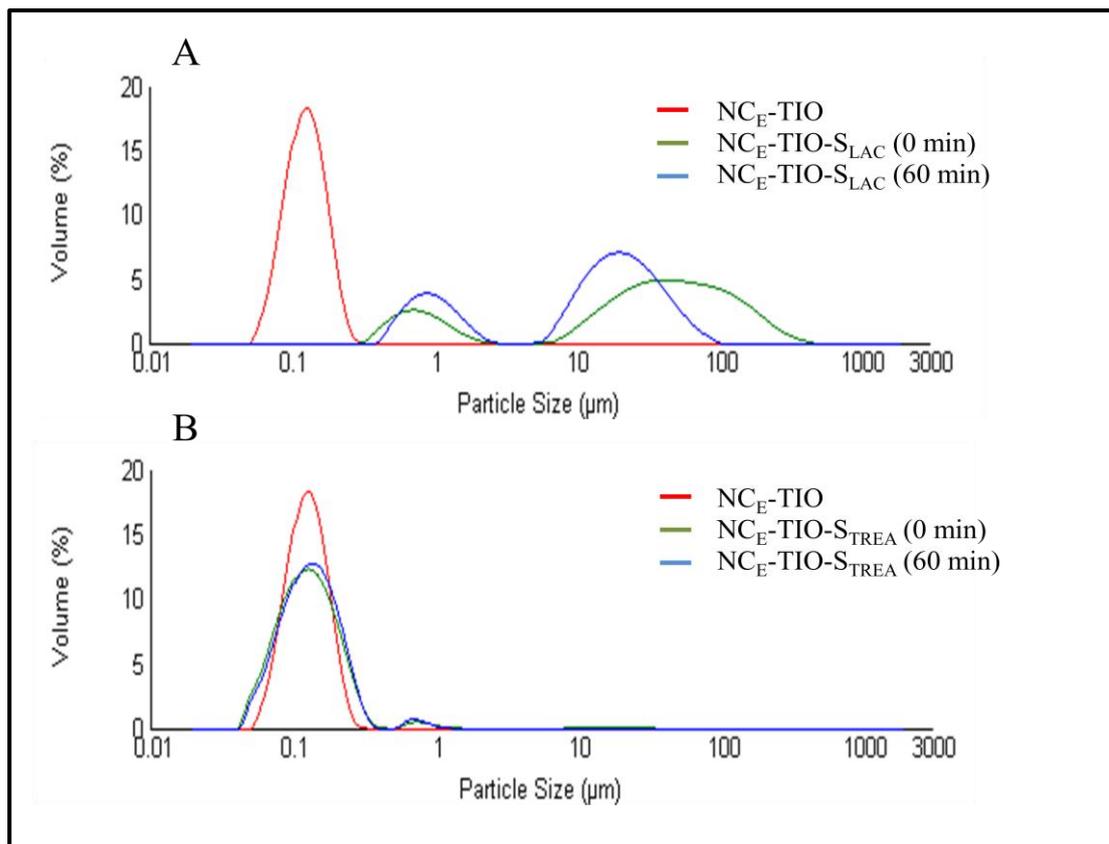


Figura 1 - Distribuição de tamanho de partículas por difração a laser da suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_E-TIO) e dos produtos secos, analisados por via-úmida, nos tempos 0 (após redispersão) e 60 minutos. (A) $NC_E-TIO-S_{LAC}$ e (B) $NC_E-TIO-S_{TREA}$.

O tamanho médio de partículas após redispersão dos pós foi realizado para verificar a recuperação do tamanho das nanopartículas originais, por espectroscopia de correção de fótons. Os produtos secos foram facilmente redispersíveis após 5 minutos de agitação, tendo em vista a solubilidade dos adjuvantes de secagem (lactose e trealose) em água. A partir dos resultados, calculou-se o índice de ressuspensão (Sf/Si), o qual representa a relação entre o tamanho das partículas dos produtos secos e o tamanho destas nas suspensões iniciais, e quanto mais próximo de 1, maior é a manutenção do diâmetro médio das partículas originais antes do processo de desidratação. Os valores obtidos para os pós desenvolvidos neste trabalho foram de 146 ± 11 nm e Sf/Si de $1,2 \pm 0,09$ ($NC_E-TIO-S_{LAC}$) e de 134 ± 04 nm e Sf/Si de $1,1 \pm 0,07$ ($NC_E-TIO-S_{TREA}$). Diferenças significativas não foram verificadas entre os pós em relação ao tamanho de partículas e o índice de ressuspensão ($p > 0,05$). Entretanto, no que se refere às formulações sem fármaco, diferenças foram observadas ($p < 0,05$), as quais apresentaram partículas de tamanho de 178 ± 10 nm e Sf/Si de $1,6 \pm 0,10$ e partículas de tamanho médio de 149 ± 04 nm e Sf/Si de $1,3 \pm 0,03$ para NC_E-B-S_{LAC} e NC_E-B-S_{TREA} , respectivamente.

Resultados semelhantes ($Sf/Si = 1,03$) foram obtidos por Hoffmeister e colaboradores (2012) na secagem de nanocápsulas contendo melatonina, utilizando Eudragit[®] S100 como polímero e a lactose como adjuvante de secagem, e por Marchiori e colaboradores (2012) na secagem de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo tretinoína ($Sf/Si = 0,93$). Da mesma forma, os resultados obtidos para os pós preparados com trealose corroboram com os encontrados na literatura na secagem de nanopartículas de PLGA contendo rifampicina ($Sf/Si = 1,25$) por *spray-drying* (TOMODA et al., 2008) e nanopartículas de PLGA contendo siRNA (JENSEN et al., 2010). A partir dos resultados, verifica-se a importância da utilização destes dissacarídeos na secagem de nanocápsulas poliméricas, a fim de manter as características próximas às das formulações originais. Em um estudo realizado por Domingues e colaboradores (2008) na secagem de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100, empregando dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem (insolúvel), o qual apresenta propriedades diferenciadas dos açúcares, o índice de ressuspensão obtido foi 2,28, tendo em vista a ampla faixa de distribuição granulométrica.

Cabe salientar que diferenças significativas não foram observadas em relação ao tamanho após redispersão dos pós contendo o fármaco em estudo ($NC_E-TIO-S_{LAC}$ e $NC_E-TIO-S_{TREA}$) ($p > 0,05$), evidenciando que o tipo de adjuvante não influenciou nesta característica, segundo as análises realizadas por espectroscopia de correlação de fótons. Desta forma, as formulações apresentaram adequada eficiência de ressuspensão considerando os referenciais de literatura para sistemas nanoestruturados (TOMODA et al., 2008; JENSEN et al., 2010; HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012). Também foi realizado o tamanho após redispersão apenas dos adjuvantes de secagem, para verificar se a presença destes influenciaria no tamanho dos sistemas nanoestruturados após desidratação. A lactose (S_{LAC}) e a trealose (S_{TREA}) secas por *spray-drying* obtiveram valores de 227 ± 13 nm e 547 ± 21 nm, respectivamente, demonstrando que estes adjuvantes não influenciaram os tamanhos após redispersão de tais sistemas, uma vez que a presença das nanoestruturas resultaram em tamanho médios de partículas menores (134 a 146 nm), sendo mais próximos aos obtidos nas formulações originais (116 ± 04 nm).

Na figura 2 está representado o perfil de distribuição de tamanho de partículas das suspensões originais em relação aos seus respectivos produtos secos redispersos em água, indicando praticamente sobreposição dos picos de população obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, demonstrando a manutenção da distribuição de tamanho próxima à original, independente do carboidrato empregado.

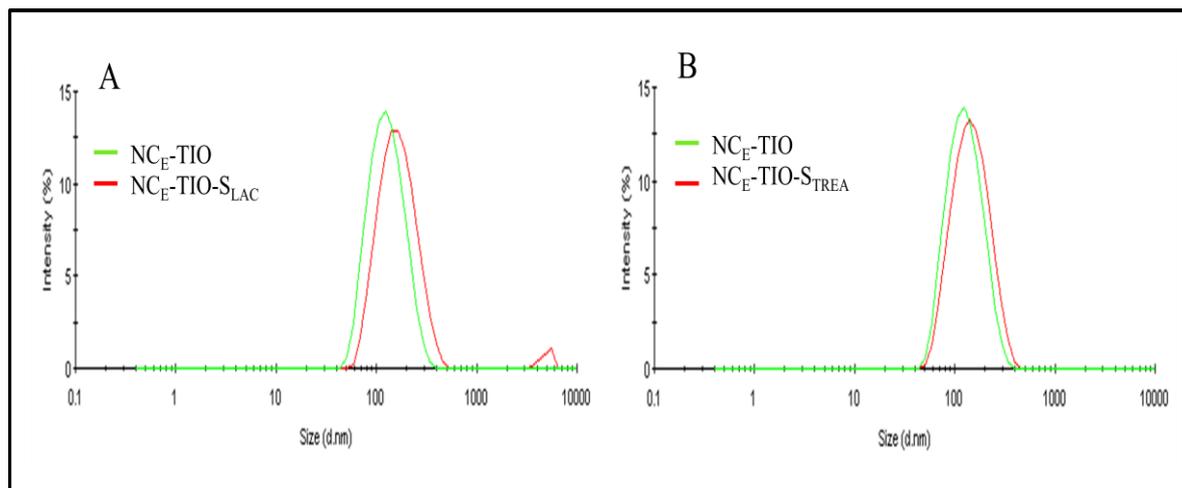


Figura 2 - Distribuição de tamanho de partículas por espectroscopia de correlação de fótons, da suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_E -TIO) e dos produtos secos após redispersão em água (A) NC_E -TIO- S_{LAC} e (B) NC_E -TIO- S_{TREA} .

O teor de umidade residual dos produtos secos foi determinado por Karl Fischer e os valores encontrados foram $2,93 \pm 0,14$ % e $3,66 \pm 0,08$ % para NC_E -TIO- S_{LAC} e NC_E -TIO- S_{TREA} , respectivamente. Cabe salientar que o teor de umidade referenciado na monografia da lactose monohidratada e da trealose di-hidratada, pelo método do Karl Fischer, é entre 4,5 a 5,5 % e 9,0 a 11,0 %, respectivamente (USP 35, 2012). Na literatura, foram encontrados valores semelhantes a este trabalho utilizando a lactose como adjuvante de secagem de nanocápsulas poliméricas (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007). Em relação à utilização de trealose, resultados semelhantes foram obtidos na secagem por aspersão de nanopartículas com PLGA (JENSEN et al., 2010). Valores inferiores de umidade foram encontrados por LI e MANSOUR (2011) na obtenção de micropartículas/nanopartículas de trealose. Estas diferenças podem estar relacionadas com uma maior temperatura de saída do *spray-dryer* durante o processo de secagem (GOULA; ADAMAPOULOS, 2005; CHAUBAL; POPESCU, 2008). Além disso, diferenças significativas entre as formulações foram observadas ($p < 0,05$), decorrente, provavelmente, da natureza química dos adjuvantes empregados, sendo que a lactose é monoidratada e a trealose di-hidratada.

A análise morfológica dos produtos secos e dos adjuvantes de secagem foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as imagens estão representadas na figura 3. Para os produtos secos contendo tioconazol utilizando a lactose como adjuvante de secagem (NC_E -TIO- S_{LAC}), verificou-se a presença de partículas arredondadas, de superfície levemente rugosa e a presença de microaglomerados com distribuição de tamanho

relativamente pequeno (Figura 3A e 3B). Resultados semelhantes foram encontrados na secagem de nanocápsulas de melatonina que utilizou o mesmo adjuvante de secagem (HOFFMEISTER et al., 2012). Em relação aos produtos secos preparados com trealose ($NC_E-TIO-S_{TREA}$) foram observadas partículas arredondadas, esféricas, com superfície mais lisa e com uma aparente maior distribuição de tamanho (Figura 3C e 3D). Resultados semelhantes foram encontrados na obtenção de produtos secos a partir de nanopartículas de rifampicina utilizando a trealose como adjuvante de secagem (TOMODA et al., 2008). Além disso, não foi possível verificar a presença de nanoestruturas nos produtos secos, por estarem, provavelmente, aderidas a matriz de lactose (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; MARCHIORI et al., 2012) ou de trealose, ou, ainda, devido à problemas associados à resolução. Através das imagens, pode-se verificar também que as formulações apresentaram tamanho de partícula geralmente menor do que 5 μm .

Adicionalmente, foi avaliada a morfologia dos adjuvantes, os quais foram submetidos à secagem sob as mesmas condições experimentais descritas para os produtos secos contendo nanocápsulas de tioconazol. A lactose (S_{LAC}), após secagem, apresentou partículas arredondadas, com o aspecto rugoso e com ampla distribuição de tamanho (Figura 3E), semelhante ao pó contendo as nanoestruturas ($NC_E-TIO-S_{LAC}$). Por outro lado, a presença de partículas arredondadas, esféricas e com aparentemente mais ampla distribuição de tamanho foram observadas para a trealose (S_{TREA}) (Figura 3F). As diferenças quanto à morfologia das partículas dos adjuvantes de secagem podem ser atribuídas as suas diferentes temperaturas de transição vítrea e solubilidade, que podem acabar influenciando durante o processo de *spray-drying* (MASTERS, 1991).

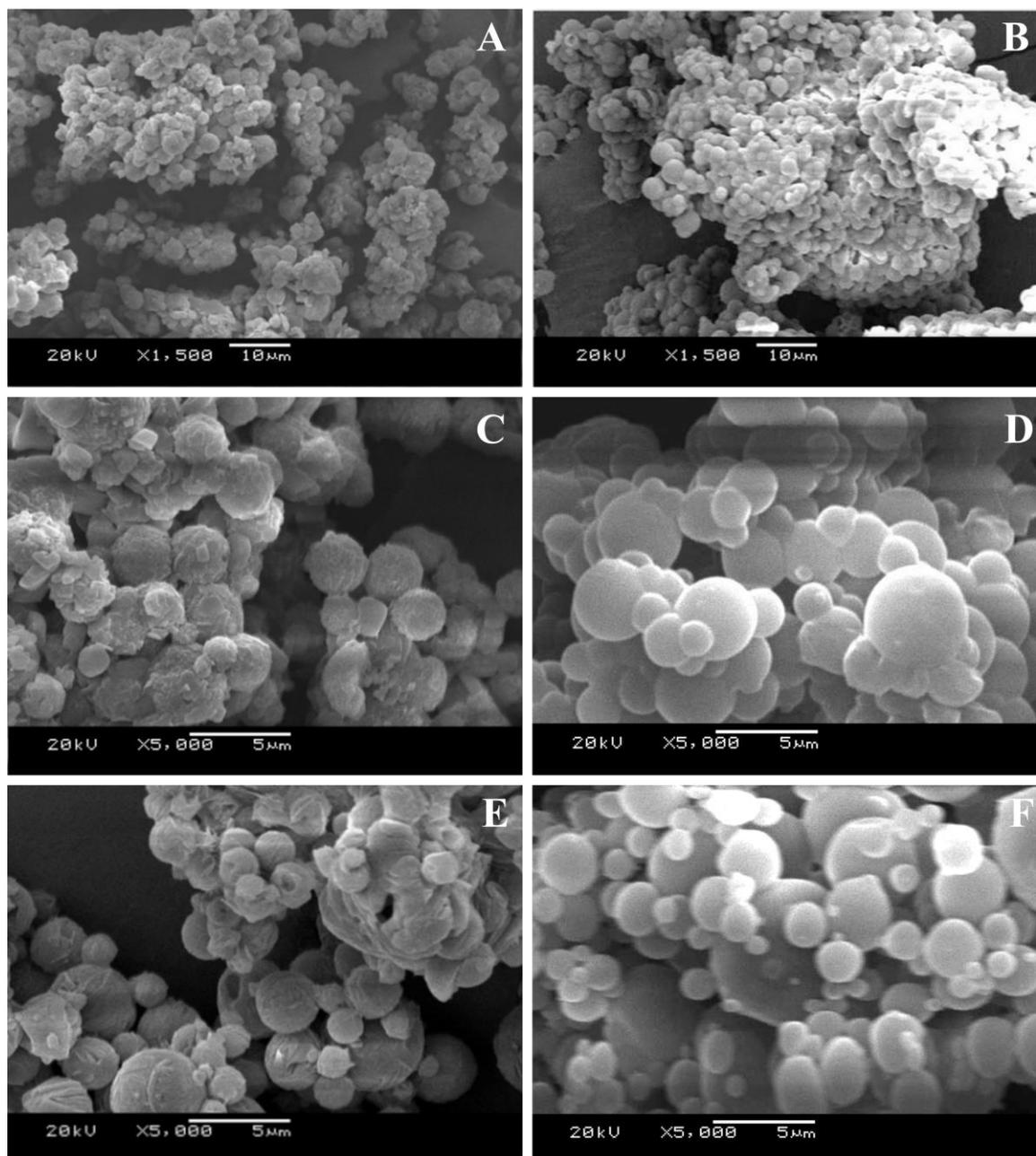


Figura 3 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos produtos secos. NC_E-TIO-S_{LAC} (A) e (C); NC_E-TIO-S_{TREA} (B) e (D); S_{LAC} (E) e S_{TREA} (F). [A e B (1,500x); C, D, E e F (5,000x)].

3.3 Estudo de estabilidade

A estabilidade da suspensão de nanocápsulas contendo tioconazol (NC_E-TIO) foi avaliada em relação ao tamanho médio de partículas, índice de polidispersão e teor de fármaco após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Para tal, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas ao abrigo da luz. Fenômenos de

sedimentação ou precipitação do polímero não foram observados neste intervalo de tempo. Os resultados obtidos nesta avaliação estão representados na figura 4.

Em relação ao tamanho médio de partículas (Figura 4A) e ao índice de polidispersão (Figura 4B), tanto as nanocápsulas contendo tioconazol (NC_E-TIO) quanto as nanocápsulas sem fármaco (NC_E-B) mantiveram suas características iniciais, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao período inicial de análise (após preparação). Da mesma forma, o teor de fármaco nas nanocápsulas permaneceu constante (Figura 4C). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura quanto à estabilidade, durante um tempo de 60 dias, de nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol, utilizando também o Eudragit[®] RS100 como polímero do sistema (SANTOS, et al., 2013).

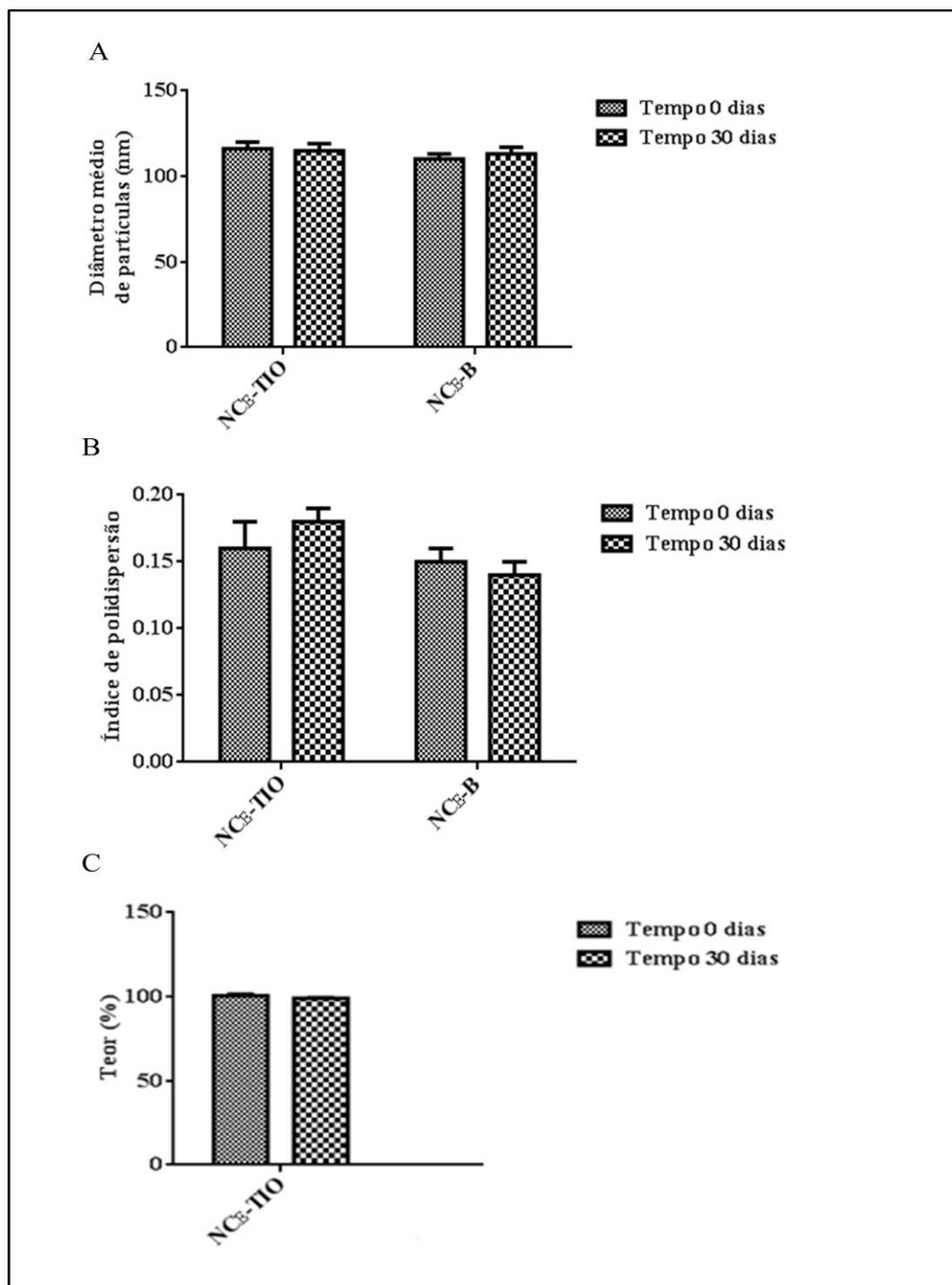


Figura 4 - Valores de tamanho médio de partículas (A), índice de polidispersão (B) e teor de tioconazol (C), determinados no estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas (NC_E-TIO e NC_E-B).

A estabilidade dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol submetidas à secagem por aspersão, utilizando como adjuvantes de secagem a lactose (NC_E-TIO-S_{LAC}) ou a trealose (NC_E-TIO-S_{TREA}), foi, também, avaliada após 30 dias

de armazenamento à temperatura ambiente (Figura 5). Macroscopicamente, não foram observadas mudanças em relação à cor dos pós.

Considerando o tamanho médio de partículas (Figura 5A) após o intervalo de 30 dias, todos os produtos secos apresentaram características semelhantes ao tempo inicial ($p > 0,05$). Os resultados obtidos utilizando a lactose como adjuvante de secagem ($NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$ e $NC_E\text{-B-S}_{LAC}$) foram: $Sf/Si = 1,1 \pm 0,13$ e $1,5 \pm 0,17$; respectivamente. Enquanto que, na utilização da trealose ($NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$ e $NC_E\text{-B-S}_{TREA}$), foram encontrados valores no índice de ressuspensão de $1,0 \pm 0,04$ e $1,3 \pm 0,03$, respectivamente.

Em relação ao teor de fármaco (Figura 5B), os produtos secos nos quais se utilizou a trealose como adjuvante de secagem ($NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$) foram estáveis durante o período de armazenamento. Porém, uma diminuição no teor de tioconazol de 36 % foi verificada para os produtos secos preparados com lactose ($NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$), podendo estar relacionada à presença de uma fração de fármaco livre na suspensão de nanocápsulas, tendo em vista a taxa de associação verificada (eficiência de encapsulamento de 86 %), além, em hipótese, de alguma incompatibilidade entre o Eudragit[®] RS100/lactose/tioconazol, com o emprego de calor no processo de secagem, que pode ter acarretado na instabilidade do tioconazol em função do tempo de armazenamento. Neste caso, a trealose se mostrou uma alternativa eficaz na secagem de nanocápsulas de tioconazol, não alterando a estabilidade do fármaco em função do tempo de armazenamento. Esta proteção pode estar relacionada à presença do grupo di-hidrato em sua estrutura, um açúcar não redutor e, portanto, no estado sólido, não suscetível a degradações químicas, como as reações de Maillard por exemplo (LI; MANSOUR, 2008). Além disso, a trealose tem demonstrado proteção para macromoléculas lábeis, proteínas e, principalmente, lipídios (ZHANG et al., 2009; LUYCKX; BAUDOUIN, 2011). Cabe ressaltar que não foram encontrados estudos relativos à incompatibilidade do tioconazol com adjuvantes. Além disto, os produtos com lactose, após o término do estudo, começaram a apresentar aspecto levemente amarelado.

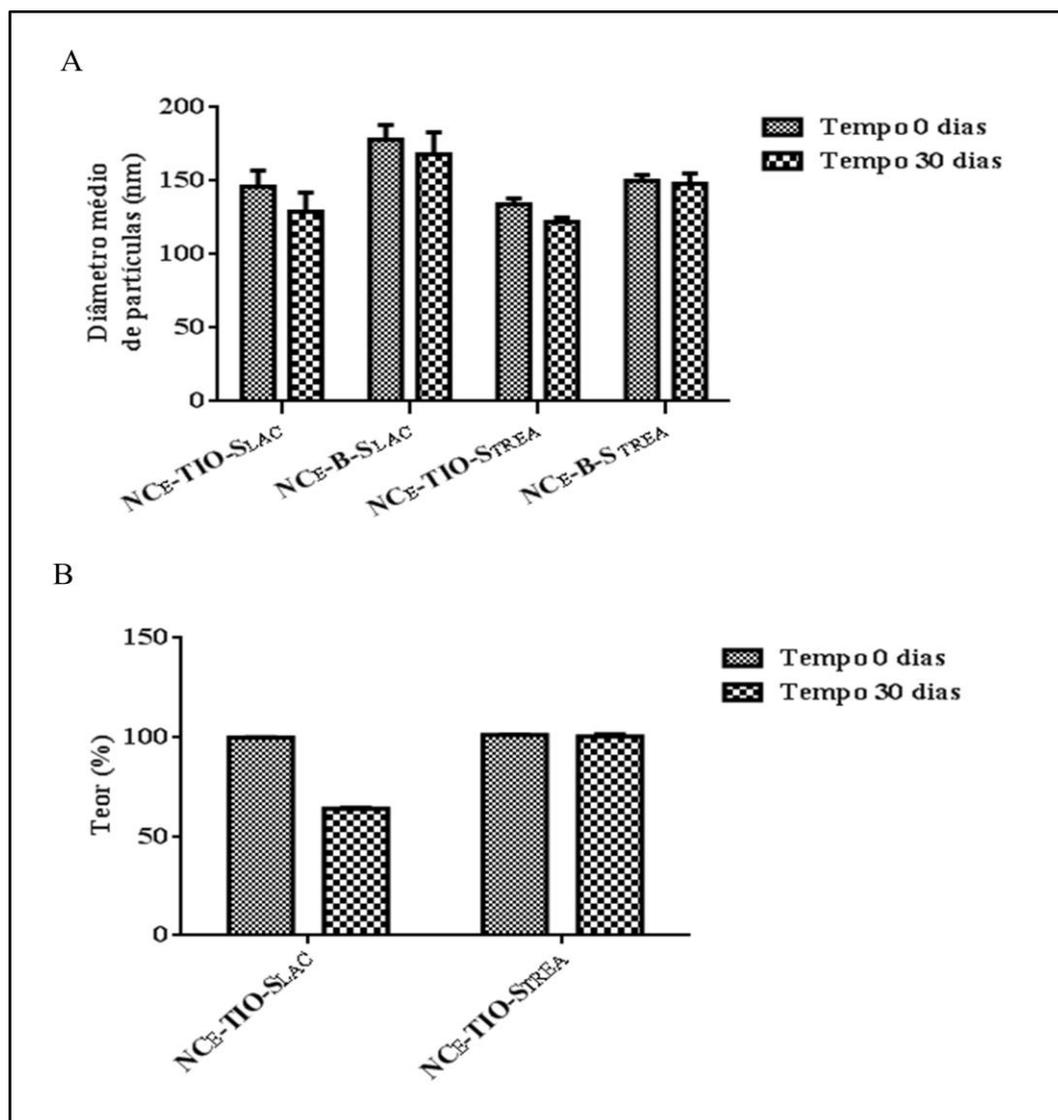


Figura 5 - Valores de tamanho médio de partículas (A) e teor de tioconazol (B) determinados no estudo de estabilidade dos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas utilizando como adjuvantes de secagem a lactose (NCE-TIO-S_{LAC} e NCE-B-S_{LAC}) ou a trealose (NCE-TIO-S_{TREA} e NCE-B-S_{TREA}).

Devido à instabilidade verificada para os produtos secos preparados por *spray-drying*, utilizando a lactose como adjuvante de secagem, as nanocápsulas contendo tioconazol foram, também, submetidas à desidratação por liofilização (NCE-TIO-L_{LAC}). A liofilização (*freeze-drying*) é um processo de desidratação a frio, no qual consiste na remoção da água de uma amostra congelada por sublimação e dessorção sob vácuo. A adição de crioprotetores é geralmente utilizada para a proteção das nanopartículas frente às condições de congelamento e desidratação (ABDELWAHED et al., 2006). Neste caso, a lactose serviu como crioprotetor nos produtos secos por liofilização. Da mesma forma, os pós obtidos foram avaliados em relação ao tamanho médio de partículas, índice de ressuspensão e teor de fármaco. O tamanho médio de partículas após redispersão dos pós em água foi de 144 ± 03 nm e Sf/Si = 1,2.

Diferenças significativas ($p > 0,05$) não foram verificadas em relação aos produtos secos preparados por *spray-drying* (NC_E-TIO-S_{LAC}). O teor de tioconazol foi de $7,11 \pm 0,04$ mg/g, próximo ao valor teórico (7,02 mg/g). Após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, não foram observadas mudanças significativas em relação às características iniciais dos pós (tamanho após redispersão = 150 ± 06 nm e teor de fármaco = $7,09 \pm 0,06$ mg/g) ($p > 0,05$). Desta forma, verificou-se que os pós preparados por liofilização, a partir de suspensão de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100, utilizando a lactose como adjuvante (NC_E-TIO-L_{LAC}), foram estáveis por um período de 30 dias em comparação aos produtos secos preparados por *spray-drying* (NC_E-TIO-S_{LAC}). Assim, o emprego do processo de desidratação a frio permitiu manter o teor de fármaco, reforçando a hipótese levantada de haver alguma incompatibilidade com o uso do calor. Para melhor caracterização, outras análises poderiam ser exploradas futuramente para melhor compreensão dos fatores envolvidos na degradação do fármaco.

3.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica da suspensão de nanocápsulas e dos produtos secos ressuspendidos contendo tioconazol foi avaliada frente à levedura de *C. albicans*, a fim de verificar se mudanças na ação do fármaco poderiam ocorrer após o processo de secagem, bem como a sua comparação com uma solução do fármaco livre (não associado às nanocápsulas) (Figura 6). As formulações sem o fármaco foram, também, analisadas para conferir a existência de alguma interação dos excipientes no ensaio.

A partir dos resultados (Figura 6), verificou-se que a presença de tioconazol ocasionou halos de inibição entre 24 e 26 mm. O fármaco presente nas suspensões de nanocápsulas (NC_E-TIO) apresentou ação sobre a *C. albicans* semelhante ao fármaco livre (S-TIO). Em relação aos produtos secos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}), halos de inibição semelhantes foram obtidos ($p > 0,05$), independente do adjuvante de secagem utilizado, demonstrando que, mesmo após o processo de secagem, a utilização de altas temperaturas não modificou a atividade antifúngica do fármaco frente ao microrganismo empregado. Uma pequena diminuição dos halos de inibição foi verificada para os produtos secos em relação à suspensão de nanocápsulas. Porém, atribuindo-se 100 % à atividade observada para as nanocápsulas, os produtos secos apresentaram um decaimento de apenas 2,6 e 4,1 % (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}, respectivamente), podendo considerar estes resultados satisfatórios no que se refere à manutenção da atividade do tioconazol após o processo de secagem. Para as amostras

sem fármaco (NC_E-B , NC_E-B-S_{LAC} , NC_E-B-S_{TREA} e solventes), não foi verificada atividade antifúngica.

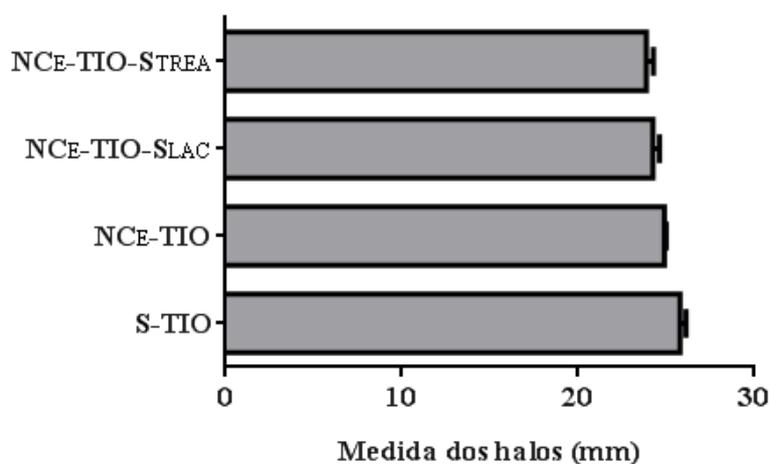


Figura 6 - Avaliação da atividade antifúngica do tioconazol frente à levedura de *C. albicans*, associado às nanocápsulas poliméricas (NC_E-TIO), produtos secos obtidos a partir das nanocápsulas ($NC_E-TIO-S_{LAC}$ e $NC_E-TIO-S_{TREA}$) e solução do fármaco livre ($S-TIO$).

Um pequeno aumento da atividade antifúngica para a solução do fármaco livre também foi encontrado por Santos e colaboradores (2013); no entanto, a associação do fármaco livre com o óleo (TCM) também apresentou atividade antifúngica e foi semelhante à das suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 contendo clotrimazol pela técnica de microdiluição, onde as nanocápsulas desenvolvidas foram consideradas promissoras para o tratamento de candidíase vulvovaginal. Em outro trabalho, Attama e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica do tioconazol associado a um carreador lipídico (microemulsão) frente à *C. albicans*, pelo método de difusão em ágar, no qual o fármaco apresentou uma boa atividade (halos de inibição de $22 \pm 0,1$ mm) em relação a uma solução de tioconazol em DMSO (halos de inibição de $16 \pm 0,3$ mm). A associação do fármaco com substâncias lipídicas pode aumentar a atividade microbiológica, pela desorganização ocasionada no citoplasma dos microrganismos, devido à ruptura da membrana plasmática ou desintegração causada por uma pressão hidrostática no interior da célula dos mesmos (CARBALLEIRA, 2008). Cabe salientar que este trabalho demonstra, pela primeira vez, a atividade antifúngica de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas obtidos por *spray-drying*.

3.5 Avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos

O estudo de liberação *in vitro* dos produtos secos foi realizado a fim de verificar a habilidade das nanoestruturas em controlar a liberação do tioconazol após a secagem em *spray-dryer*, utilizando a lactose ou a trealose como adjuvantes. O perfil de liberação do tioconazol a partir dos pós ressuspensos foi comparado a uma solução metanólica do fármaco livre (S-TIO). Para a quantificação do fármaco nas amostras, o método analítico foi validado e mostrou-se específico (não se verificou interferência do meio receptor no pico cromatográfico do fármaco), linear na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL ($y = 48733x + 1997,1$; $r^2 = 1$; ANOVA: regressão linear significativa – $F_{\text{calculado}} = 88702,47 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$, e ausência de desvio de linearidade – $F_{\text{calculado}} = 1,09 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$) e preciso (DPR = 1,68 % e 1,63 % para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente).

Os resultados obtidos demonstraram que o tioconazol presente nos produtos secos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}) foi liberado de maneira semelhante, apresentando perfis muito próximos, ($p > 0,05$; Figura 7), sendo que os adjuvantes de secagem não influenciaram de forma importante a liberação do fármaco, corroborando com os índices de ressuspensão determinados através de espectroscopia de correlação de fótons. Em comparação ao fármaco livre, após 6 horas, verificou-se uma liberação de 23 e 28 % para os produtos secos reconstituídos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}, respectivamente) e uma difusão de, aproximadamente, 100 % para a solução de tioconazol. Após 48 horas, 68 % e 67 % do fármaco foi liberado a partir dos pós reconstituídos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}, respectivamente).

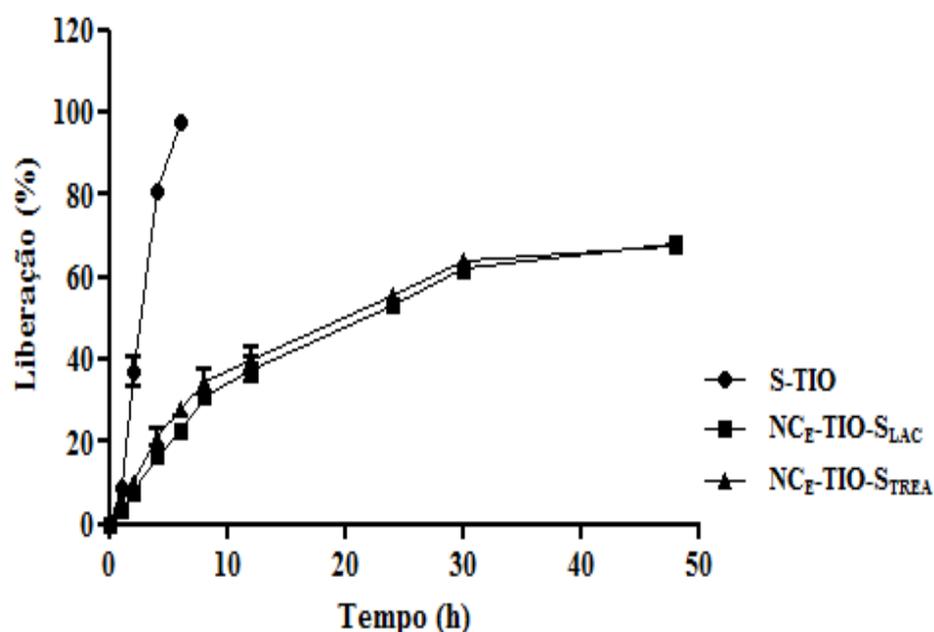


Figura 7 - Perfis de liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos produtos secos contendo nanocápsulas (NC_F-TIO-S_{LAC} e NC_F-TIO-S_{TREA}) e da solução metanólica (S-TIO).

Os perfis de liberação foram modelados empregando os modelos matemáticos de ordem zero, monoexponencial e biexponencial. De acordo com o coeficiente de correlação (r) e o critério de seleção do modelo (MSC), para a solução metanólica, ou seja, fármaco livre, o melhor ajuste foi o modelo de ordem zero ($k = 17,3883 \pm 0,2206 \text{ h}^{-1}$; $r = 0,9821 \pm 0,0013$ e $\text{MSC} = 2,9318 \pm 0,0706$). Para os produtos secos contendo tioconazol, o melhor modelo matemático foi o de segunda ordem ($r > 0,99$), demonstrando uma liberação mais rápida na fase inicial (*efeito burst*), seguida por uma etapa sustentada (Tabela 3) (SIEPMANN, SIEPMANN, 2008). A fase *burst* geralmente está relacionada com a porção de fármaco que está localizada mais superficialmente na partícula, ou seja, mais disponível para ser liberada rapidamente (CRUZ et al., 2006).

Tabela 3 - Constantes de velocidade (k1 e k2), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos na modelagem matemática dos perfis de liberação do tioconazol a partir dos produtos secos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA})

	NC _E -TIO-S _{LAC}	NC _E -TIO-S _{TREA}
Ordem zero		
k (1/h)	1,8121 ± 0,0277	1,8686 ± 0,0404
r	0,9362 ± 0,0038	0,9126 ± 0,0125
MSC	1,2565 ± 0,0638	0,8322 ± 0,1794
Monoexponencial		
k (1/h)	0,0328 ± 0,0012	0,0363 ± 0,0024
r	0,9858 ± 0,0008	0,9766 ± 0,0049
MSC	2,8583 ± 0,0653	2,1943 ± 0,2484
Biexponencial		
k1 (1/h)	0,0831 ± 0,0046	0,1053 ± 0,0246
k2 (1/h)	0,0085 ± 0,0011	0,0076 ± 0,0031
a (mg/mL)	0,5495 ± 0,0328	0,5483 ± 0,0569
b (mg/mL)	0,4584 ± 0,0319	0,4527 ± 0,0558
r	0,9984 ± 0,0009	0,9977 ± 0,0010
MSC	5,0817 ± 0,7481	4,6545 ± 0,4462
Lei das potências		
a	8,7160 ± 0,3961	11,3139 ± 1,3976
n	0,5531 ± 0,0090	0,4869 ± 0,0287
r	0,9868 ± 0,0007	0,9839 ± 0,0018
MSC	3,1807 ± 0,0552	3,0058 ± 0,1162

Os valores das constantes de velocidade relacionados à fase *burst* (k1) dos produtos secos foram: $0,0831 \pm 0,0046 \text{ h}^{-1}$ (NC_E-TIO-S_{LAC}) e $0,1053 \pm 0,0246 \text{ h}^{-1}$ (NC_E-TIO-S_{TREA}) ($p > 0,05$); enquanto que os valores na fase sustentada (k2) foram: $0,0085 \pm 0,0011 \text{ h}^{-1}$ e $0,0076 \pm 0,0031 \text{ h}^{-1}$ (NC_E-TIO-S_{LACT} e NC_E-TIO-S_{TREA}, respectivamente) ($p > 0,05$). Os valores de “a” estão relacionados às concentrações iniciais do fármaco liberado e indicam que, provavelmente, cerca de 55 % do fármaco está adsorvido às nanoestruturas ou independentemente livre em ambos produtos secos (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}). Por sua vez, em relação à fase sustentada (b), cerca de 45 - 46 % do tioconazol estão retidos dentro das nanocápsulas, frações semelhantes independente do tipo de produto seco

($p > 0,05$). Com estes resultados, pode-se inferir a hipótese de que os produtos secos apresentaram comportamentos de liberação do tioconazol semelhantes, devido à análoga localização do mesmo nas partículas, tanto obtidas com trealose quanto com lactose como adjuvante de secagem.

Em relação ao tempo de meia-vida das formulações, a solução de tioconazol (S-TIO) apresentou uma difusão mais rápida através da membrana de diálise ($t_{1/2} = 2,90$ h) quando comparada a dos produtos secos redispersos de $NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$ ($t_{1/2}$ na fase inicial = 8,34 h e $t_{1/2}$ na fase sustentada = 81,53 h) e de $NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$ ($t_{1/2}$ na fase inicial = 6,58 h e $t_{1/2}$ na fase sustentada = 91,18 h). A partir destes resultados, verificou-se que entre os produtos secos com lactose ($NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$) e trealose ($NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$) não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao tempo de meia-vida entre a fase inicial e também entre a fase sustentada ($p > 0,05$); além disso, as quantidades liberadas nas duas fases foram bastante semelhantes entre os adjuvantes.

Em uma última avaliação, o mecanismo de liberação do fármaco nos produtos secos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol também pode ser investigado através do modelo da lei da potência (Korsmeyer - Peppas), o qual avalia o mecanismo de liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos, pela determinação do expoente de liberação (n) para sistemas que apresentam uma geometria esférica, sendo denominados: (a) $n = 0,43$ indicando difusão Fickiana; (b) $0,43 < n < 0,85$ correspondente ao transporte anômalo e (c) $n \geq 0,85$ transporte de caso II (PEPPAS, 1985). Os resultados encontrados foram de 0,55 e 0,49 para $NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$ e $NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$, respectivamente, correspondendo a um transporte anômalo, no qual a liberação do tioconazol é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas (Eudragit[®] RS100) seguido da sua difusão. Este polímero, por se tratar de um copolímero de metacrilato de amônio (copolímero insolúvel em água) é utilizado para promover a liberação de fármacos de forma sustentada, atuando em relação à permeabilidade no organismo de forma pH-independente (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006), corroborando com o perfil de liberação sustentada do fármaco verificado neste trabalho.

Desta forma, verifica-se a importância do polímero Eudragit[®] RS100 em possibilitar uma liberação controlada de substâncias ativas, e, adicionalmente, por ser um polímero catiônico, apresenta boas propriedades bioadesivas (NIKAM et al., 2011), sendo uma interessante alternativa para a retenção das nanopartículas contendo o fármaco no local de ação (CONTRI et al., 2011; SANTOS et al., 2013), tendo relevância na aplicação cutânea.

4 CONCLUSÃO

A finalidade deste trabalho foi desenvolver produtos secos redispersíveis obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol, utilizando dois adjuvantes de secagem, a lactose e a trealose, a fim de compará-los frente ao processo de secagem por aspersão. Ambos os produtos apresentaram adequada redispersibilidade em água e atividade antifúngica após o processo de secagem; entretanto, a utilização de trealose possibilitou obter pós com características mais semelhantes às suspensões originais, além de manter o teor de fármaco durante o armazenamento. Os perfis de liberação entre os pós foram semelhantes e as nanocápsulas, após secagem, possibilitaram controlar a liberação do tioconazol. Desta forma, os adjuvantes de secagem, em especial a trealose, mostrou-se promissora na secagem, por *spray-drying*, de nanocápsulas poliméricas para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas destinadas à aplicação tópica de fármacos antifúngicos como o tioconazol.

5 REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- 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.
- AUVILLAIN, M.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S.T.P. Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 738-744, 1989.
- BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.
- 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.
- BECK, R. C. R.; OURIQUE, A. F.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceutics: a review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, p.195-208, 2012.

- BHARDWAJ, S. P.; SURYANARAYANAN, R. Molecular mobility as an effective predictor of the physical stability of amorphous trehalose. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3209-3217, 2012.
- CARBALLEIRA, N. M.; New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 50-61, 2008.
- CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 671-675, 2004.
- CHAUBAL, M. V.; POPESCU, C. Conversion of nanosuspensions into dry powders by spray drying: a case study. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2302-2308, 2008.
- CONTRI, R. V.; KAISER, M.; POLETTO, F. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2398-2406, 2011.
- CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2087-2093, 1996.
- CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; 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.
- DE CHASTEIGNER, S., FESSI, H., CAVÉ, G., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 5, p. 242-246, 1995.
- DE DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 3, p. 33-39, 2011.
- DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Vol.1, 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.
- 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.
- FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 616-621, 2010.

- FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 187-217, 1988.
- GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 353-367, 2008.
- 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.
- GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.
- HEIKKILA, H.; STUBB, S.; REITAMO, R. A study of 72 patients with contact allergy to tioconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 134, p. 678-680, 1996.
- HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, p. 1-13, 2012.
- ISLAM, M. I. U.; LANGRISH, T. A. G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, v. 43, p. 46-56, 2010.
- JENSEN, D. M. K.; CUN, D.; MALTESEN, M. J.; FROKJAER, S.; NIELSEN, H.M.; FOGED, C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 138-145, 2010.
- KATATA, L.; TSHWEU, L.; NAIDOO, S.; KALOMBO, L.; SWAI, H. Design and formulation of nano-sized spray dried efavirenz-part I: influence of formulation parameters. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1247-1254, 2012.
- KHO, K.; CHEOW, W. S.; LIE, R. H.; HADINOTO, K. Aqueous re-dispersibility of spray-dried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. **Powder Technology**, v. 203, p. 432-439, 2010.
- LEE, G., 2002. Spray-drying of proteins. In: Carpenter, J.F., Manning, M.C. (Eds.), *Rational Design of Stable Protein Formulations*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 135-158.
- LI, X.; MANSOUR, H. M. Physicochemical characterization and water vapor sorption of organic solution advanced spray-dried inhalable trehalose microparticles and nanoparticles for targeted dry powder pulmonary inhalation delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 4, p. 1420-1430, 2011.

LUYCKX, J.; BAUDOUIN, C. Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. **Clinical Ophthalmology**, v. 5, p. 577-581, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

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.

MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2059-2067, 2012.

MASTERS, K., 1991. Spray Drying Handbook, 5th edition. Longman Scientific and Technical, London.

MAURY, M.; MURPHY, K.; KUMAR, S.; SHI, L.; LEE, G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 565-573, 2005.

MISHRA, B.; BHAVESH, P.B.; TIWARI S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications 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, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P.R.; GUTERRES, S.S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343-347, 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.

NIKAM, V. K.; KOTADE, K. B.; GAWARE, V. M.; DOLAS, R. T.; DHAMAK, K. B.; SOMWANSHI, S. B.; KHADSE, A. N.; KASHID, V. A. Eudragit a versatile polymer: A Review. **Pharmacologyonline**, v. 1 p. 152-164, 2011.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637-652, 2008.

ÓGÁIN, O. N.; LI, J.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I—Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 23-35, 2011.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, p. 110-111, 1985.

PILCER, G.; WAUTHOZ, N.; AMIGHI, K. Lactose characteristics and the generation of the aerosol. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 233-256, 2012.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanosphers: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

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 gastrintestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-72, 2003.

RÉ, M-I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, p. 433-446, 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th edition, 2006.

RUBIO, M. C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J. G.; RUESCA, R. B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.16, p. 16-22, 1999.

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.

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. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.

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

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p. 124-135, 2007.

TOMODA, K.; OHKOSHI, T.; KAWAI, Y.; NISHIWAKI, M.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: Effects of the temperature at a spray-dryer inlet upon the properties of particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, p. 138-144, 2008.

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

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTI, 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.

WENDORF, J. R.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Reduced protein adsorption at solid interfaces by sugar excipients. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, p. 565–573, 2004.

ZHANG, W.; RONG, J.; WANG, Q.; HE, X. The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule. **Nanotechnology**, v. 20, p. 275101 (14pp), 2009.

DISCUSSÃO GERAL

O tioconazol se trata de um antifúngico pertencente a família dos azóis, que por apresentar um anel imizadólico em sua composição, lhe confere um amplo espectro de ação antifúngica frente a microrganismos como a *Candida albicans*, dermatófitos e algumas bactérias gram-positivas (SWEETMAN, 2006). No entanto, devido a sua reduzida absorção cutânea, a sua utilização em altas concentrações, principalmente para o tratamento de onicomicoses (MUÑOZ et al., 2010), pode acarretar efeitos tópicos indesejáveis (STUBB et al., 1992; SWEETMAN, 2006).

Os sistemas nanocarreadores, em especial as nanopartículas poliméricas, se apresentam como uma alternativa para contornar os obstáculos apresentados pelo tioconazol. Considerando o fato que estes sistemas apresentam diversas vantagens, como o aumento da eficácia de fármacos, pelo seu direcionamento no local de ação (SCHAFFAZICK et al., 2003a; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006), podendo modular a velocidade e o local de liberação de substâncias ativas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010), consequentemente, proporcionando a redução dos efeitos adversos (CASTRO et al., 2009) e a diminuição da frequência de administração de dose para a permanência dos níveis terapêuticos (NIMESH et al., 2006). No entanto, por se apresentarem na forma de suspensões aquosas, estes sistemas podem sofrer processos de instabilidade em meio aquoso, como a precipitação do polímero e/ou sedimentação das partículas e contaminação microbiana (GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012).

A partir destas observações, no Capítulo 1, foi estudado a utilização de técnicas de desidratação das formulações líquidas (nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões) utilizando a secagem por aspersão (à quente) e a liofilização (a frio), afim de comparar as suas influencias no desenvolvimento de formulações sólidas. Para tal, suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC_p-TIO) foram preparadas utilizando a poli(ϵ -caprolactona), um polímero semi-cristalino e biodegradável (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Para avaliar a influência da parede polimérica em tais suspensões após o processo de desidratação, nanoemulsões também foram preparadas e avaliadas. As suspensões de nanocápsulas e as nanoemulsões foram caracterizadas em relação ao diâmetro de partículas, índice de polidispersão, pH e teor de fármaco. Ambas as formulações apresentaram características satisfatórias: tamanho nanométrico (170 - 206 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,20, pH ácido (5 - 6), teor de fármaco próximo ao valor

teórico (1,0 mg/mL) e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100 %. Além disso, as amostras mantiveram-se estáveis a temperatura ambiente por um período de 30 dias.

Logo após o desenvolvimento das formulações líquidas, estas foram dispersas em um adjuvante, a lactose (10 %, m/v), conhecida por ser altamente solúvel em água e, desta forma, apresentar uma boa redispersão neste meio, o que é ideal para a permanência das características das formulações de origem, além das suas características amorfas e de alta temperatura de transição vítrea (~ 104 °C) (ISLAM; LANGRISH, 2010), conferindo estabilidade aos sistemas durante o processo de desidratação (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; KHO et al., 2010), além de ser uma boa candidata como crioprotetor para a liofilização (WESSMAN; EDWARDS; MAHLIN, 2010).

Os produtos secos obtidos a partir da secagem por aspersão e pela liofilização foram avaliados quanto ao rendimento do processo. A técnica da secagem por aspersão apresentou valores entre 60 – 70 %, semelhantes aos reportados em outros trabalhos que utilizaram também a lactose como adjuvante (TEWA-TAGNE et al., 2007), e inferiores aos obtidos na liofilização (95 – 100 %). No que se refere ao teor de fármaco, ambos os processos possibilitaram obter valores próximos aos teóricos: 7,02 mg/g e 7,55 mg/g para os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas (NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L) e nanoemulsões (NE-TIO-S e NE-TIO-L), respectivamente. O perfil de desaglomeração dos pós após dispersão em água foi avaliado por difração a laser. Nesta análise se verificou que todas as formulações apresentaram populações nanométricas, umas com maior intensidade que as outras, pela diferença no tipo de estrutura e técnica de desidratação, confirmando a eficiência da redispersão de tais sistemas em recuperar, parcial ou totalmente, o tamanho dos sistemas nanoestruturados originais.

O tamanho médio das partículas após redispersão dos pós em água foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons, e comparado com o tamanho das formulações originais, calculando-se o índice de ressuspensão (Sf/Si). Valores de Sf/Si próximos a 1,0 foram verificados para os pós preparados a partir das nanoemulsões, independente do processo de desidratação, e para as nanocápsulas submetidas à liofilização. Entretanto, valores mais baixos foram verificados para os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol por secagem por aspersão (Sf/Si = 0,7). De acordo com a literatura, esta diferença pode ser atribuída às mudanças na estrutura do polímero (rearranjo molecular) que podem ocorrer durante o processo de desidratação por *spray-drying*, tendo em vista as altas temperaturas empregadas e ao ponto de fusão da PCL (cerca de 60 °C) (KHO et al., 2010).

A determinação do teor de umidade residual foi determinada por Karl Fischer e os produtos secos apresentaram valores satisfatórios e inferiores a 4,2 %. A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo possível verificar diferenças entre os produtos secos obtidos pelos dois métodos de desidratação, relacionadas ao comportamento do adjuvante em tais processos. Os produtos secos obtidos a partir da secagem por aspersão (NC_P-TIO-S e NE-TIO-S) apresentaram partículas arredondadas de superfície lisa; partículas com bordas mais irregulares e disformes foram verificadas para os produtos secos obtidos por liofilização (NC_P-TIO-L e NE-TIO-L), nos quais a utilização de adjuvantes amorfos pode colaborar com as irregularidades (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006d). Além disso, em ambos os processos, a presença da parede polimérica não influenciou na morfologia dos pós e não foram observadas estruturas de tamanho nanométrico na superfície dos mesmos, sugerindo que estas se encontram na matriz das partículas de lactose. Estes resultados estão de acordo com relatos na literatura, no qual as nanopartículas não foram visualizadas na superfície de micropartículas de lactose (TEWA-TAGNE et al., 2007; MARCHIORI et al., 2012), podendo-se sugerir que quando o adjuvante não está solubilizado na suspensão aquosa de nanopartículas, como é relatado na utilização de dióxido de silício coloidal, as nanoestruturas tendem a se depositar sobre a superfície do adjuvante (MÜLLER et al., 2000; BECK et al., 2006). No entanto, quando o adjuvante está solúvel, como é o caso da lactose, este se dispersa nas suspensões e seca juntamente com as nanoestruturas, formando microaglomerados com organização estrutural aleatória (TEWA-TAGNE et al., 2007).

A estabilidade dos produtos secos preparados a partir das nanocápsulas e nanoemulsões submetidas à secagem por aspersão e à liofilização foi monitorada após 30 dias de sua preparação. Em relação ao diâmetro médio de partículas, os produtos secos mantiveram semelhantes após o intervalo de 30 dias ($p > 0,05$) e apenas a NE-TIO-S diferiu significativamente ($p < 0,05$). Em relação ao teor de fármaco, todos os produtos mantiveram-se estáveis; no entanto, os produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões por *spray-drying* (NE-TIO-S) apresentaram uma diminuição de 29 % no teor de tioconazol, evidenciando a importância da parede polimérica em proteger o fármaco frente ao armazenamento.

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método de difusão em ágar frente à levedura *Candida albicans*. As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol e os produtos secos obtidos por tais sistemas, tanto por *spray-drying* e liofilização, apresentaram ação frente à levedura. Cabe salientar que os processos de desidratação em que as nanoestruturas foram submetidas não influenciaram na atividade antifúngica do fármaco, se

tornando inédito este tipo de estudo em relação aos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas poliméricas.

De posse dos resultados encontrados neste trabalho, os produtos secos preparados a partir de nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (por *spray-drying* e liofilização) se mostraram promissores para a realização do estudo de liberação *in vitro* do fármaco. Para tal, empregou-se a técnica de sacos de diálise, seguindo as condições *sink*, utilizando como meio de liberação água:etanol (70:30, v/v) e a quantificação do tioconazol foi determinada por cromatografia líquida. Uma liberação controlada do fármaco foi verificada para os produtos secos obtidos por *spray-drying* (NCP-TIO-S) e liofilização (NCP-TIO-L), os quais apresentaram 53 % e 74 % de fármaco liberado em 48 horas, respectivamente. Comparando estes resultados com a solução do fármaco livre (S-TIO), uma difusão completa do tioconazol foi verificada após 6 horas (modelo de ordem zero; $k = 17,3883 \pm 0,2206/h$). Trabalhos relatados na literatura comprovam este controle na liberação de fármacos em suspensões de nanocápsulas (CRUZ et al., 2006; FONTANA et al., 2010; SANTOS et al., 2013) e em produtos secos a partir de nanocápsulas (HOFFMEISTER et al., 2010). Além disso, a liberação do tioconazol a partir dos pós seguiu um modelo biexponencial, representado por uma liberação inicial rápida (*efeito burst*), seguida por uma lenta liberação do fármaco, em que 79 % e 43 % do mesmo se encontra dentro da nanopartícula, e 20 % e 61 % do fármaco está adsorvido ou independentemente livre no sistema para os produtos secos obtidos por *spray-drying* e liofilização, respectivamente. Em relação ao mecanismo de liberação do tioconazol, utilizando a Lei das Potências, os produtos secos apresentaram valores de 0,68 e 0,45 para NC_P-TIO-S e NC_P-TIO-L, respectivamente, indicando um transporte anômalo, através do inchamento ou relaxamento das cadeias de polímero seguido da difusão do fármaco. Desta forma, é possível verificar que o tipo de método de desidratação (*spray-drying* e liofilização) influenciou na extensão da liberação do tioconazol. Resultados semelhantes foram reportados na literatura (REBOUÇAS et al., 2012). Ainda, a liberação mais prolongada dos produtos secos preparados pela secagem por aspersão (NC_P-TIO-S) pode estar relacionada a maior quantidade de fármaco localizado dentro das partículas (79 %).

Pelo fato da técnica de secagem por aspersão ter demonstrado melhores resultados em relação à liberação do fármaco, o Capítulo 2 propôs a secagem de nanocápsulas de tioconazol, utilizando o Eudragit[®] RS100 como polímero, de características diferenciadas da PCL, por ser um polimetacrilato biocompatível, pH independente e, devido a presença de grupamentos catiônico, apresenta propriedades mucoadesivas (PIGNATELLO et al., 2002). Além disso, foi empregado dois adjuvantes de secagem, de maneira independente: a lactose e a trealose, este

um açúcar dissacarídeo, altamente solúvel em água e com uma maior temperatura de transição vítrea ($\sim 117\text{ }^{\circ}\text{C}$) (BHARDWAJ; SURYANARAYANAN, 2012), inédito para a obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas por *spray-drying*.

As suspensões de nanocápsulas, após preparação, apresentaram tamanho nanométrico (110 - 116 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,17 e pH em torno de 4,8 - 5,3. Resultados semelhantes quanto ao desenvolvimento de nanocápsulas utilizando Eudragit[®] RS100 como polímero foram reportados na literatura (SCHAFFAZICK et al., 2006; DOMINGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2013). O teor de fármaco foi próximo ao valor teórico (1,0 mg/mL) e a eficiência de encapsulamento foi de 86 %. Este resultado pode estar relacionado com uma provável diferença de afinidade do fármaco com o polímero, visto que as nanocápsulas preparadas com PCL, reportadas no capítulo 1, apresentaram taxa de associação próxima a 100 %. Após o desenvolvimento das suspensões, estas foram dispersas em lactose ou trealose (10 %, m/v) para posterior desidratação.

Os produtos secos obtidos a partir da secagem por aspersão foram avaliados em relação ao rendimento do processo, no qual apresentaram valores entre 64 – 69 % e 54 – 57 % para os produtos secos com lactose e trealose, respectivamente. Estes resultados foram satisfatórios e superiores aos valores reportados na literatura na secagem de nanocápsulas com lactose (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012) e trealose (JENSEN et al., 2010) como adjuvantes. O teor de fármaco foi próximo ao teórico, (7,02 mg/g), demonstrando que não ocorreu degradação do mesmo durante o processo de desidratação empregando altas temperaturas.

A avaliação da distribuição das partículas foi realizada por difração a laser, afim de avaliar o perfil de desaglomeração dos produtos secos, após a redispersão em água. Um perfil de distribuição semelhante à suspensão de origem foi verificado para os produtos secos preparados com trealose, indicando a recuperação das nanoestruturas pela boa redispersibilidade do sistema.

O tamanho médio das partículas após redispersão dos pós em água foi realizado por espectroscopia de correlação de fótons, calculando-se, posteriormente, o índice de ressuspensão. Os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas contendo tioconazol utilizando a lactose como adjuvante ($\text{NC}_{\text{E-TIO-S}_{\text{LAC}}}$) apresentaram $\text{Sf/Si} = 1,2$. Diferença em relação aos pós preparados a partir de nanocápsulas de PCL ($\text{NC}_{\text{P-TIO-S}_{\text{LAC}}}$, capítulo 1) foi verificada ($\text{Sf/Si} = 0,7$), e pode estar relacionada aos diferentes pontos de fusão dos polímeros. Para o Eudragit[®] RS100, o ponto de fusão relatado é de $174,23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (USP 32, 2009), superior ao da PCL, e pode ter influenciado na permanência do tamanho das partículas dos

produtos secos. Em relação aos produtos secos preparados com trealose ($NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$), os resultados obtidos foram próximos a 1,0 ($Sf/Si = 1,1$), corroborando com valores reportados na literatura (TOMODA et al., 2008).

O teor de umidade residual dos pós foi determinado por Karl Fischer e os valores encontrados para os produtos secos foram satisfatórios e inferiores a 4 %. A análise morfológica foi realizada e para os pós preparados com a lactose ($NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$) foram visualizadas partículas arredondadas, de superfície levemente rugosa. Em relação aos produtos secos preparados com trealose ($NC_E\text{-TIO-S}_{TREA}$), partículas arredondadas, esféricas e com superfície lisa foram observadas. A presença das nanoestruturas não foi verificada em ambos os produtos, por estarem, provavelmente, aderidas a matriz de lactose (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; MARCHIORI et al., 2012) e a matriz da trealose, esta por se tratar, também, de um adjuvante solúvel em água. Partículas com tamanhos menores que 5,0 μm foram visualizadas em ambos os produtos secos.

A estabilidade das suspensões de nanocápsulas ($NC_E\text{-TIO}$) foi realizada por um período de 30 dias (amostras armazenadas a temperatura ambiente) e as formulações mantiveram suas características iniciais, não havendo diferenças em relação ao tamanho, polidispersão e teor de fármaco ($p > 0,05$). Da mesma forma, a estabilidade dos produtos secos foi monitorada. No que se refere ao diâmetro médio de partículas, os produtos mantiveram semelhança em 30 dias e diferenças significativas não foram observadas em relação aos índices de ressuspensão ($p > 0,05$). Em relação ao teor de fármaco, os produtos secos preparados com trealose foram estáveis; no entanto, os produtos secos preparados com lactose sofreram uma redução de 36 % de tioconazol. Esta diminuição na concentração inicial de fármaco pode estar relacionada a menor eficiência de encapsulamento verificada para as nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 (86 %) em comparação com as de PCL (aproximadamente 100 %), as quais permaneceram estáveis durante o estudo. Ainda, a literatura reporta a utilização da trealose na proteção de macromoléculas lábeis, proteínas e lipídios (ZHANG et al., 2009; LUYCKX; BAUDOUIN, 2011). Outra hipótese que pode ser abordada em relação à instabilidade da $NC_E\text{-TIO-S}_{LAC}$ é a relação polímero/calor/lactose. Para comprovar se o processo de aquecimento poderia influenciar na estabilidade dos pós, as nanocápsulas foram, também, submetidas à desidratação por liofilização ($NC_E\text{-TIO-L}_{LAC}$), as quais após 30 dias de armazenamento se mantiveram estáveis e mudanças significativas não foram verificadas em relação ao teor de tioconazol ($p > 0,05$). A partir deste resultado é visto que a relação polímero/calor/lactose teve influência na estabilidade dos pós, obtidos a partir da secagem por aspersão, utilizando a lactose como adjuvante.

Da mesma forma abordada no capítulo 1, a atividade antifúngica dos pós frente à *C. albicans* foi realizada, sendo possível verificar a ação do fármaco quando associado às nanocápsulas e dos produtos secos obtidos a partir das nanoestruturas (NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}). Além disso, comparando os halos de inibição das nanocápsulas e dos produtos secos, é possível afirmar que o processo de secagem a altas temperaturas manteve a ação do fármaco frente à levedura.

A avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos produtos secos foi realizada empregando a técnica de sacos de diálise, de acordo com as condições referenciadas no capítulo 1. Resultados semelhantes foram obtidos entre os pós, não havendo interferência significativa do adjuvante na liberação do tioconazol a partir dos pós (liberação de 68 % e 67 % do fármaco em 48 horas para os pós preparados com lactose e trealose, respectivamente). Além disso, comparando-se estes resultados com uma solução de tioconazol, a qual demonstrou uma difusão completa do fármaco para o meio de liberação após 6 horas, a associação do tioconazol às nanoestruturas e posterior desidratação, foi capaz de promover um controle na liberação do mesmo. Para melhor compreensão dos resultados, a modelagem matemática foi realizada. Para a solução do fármaco livre (S-TIO) o melhor ajuste foi o modelo de ordem zero ($k_1 = 17,3883 \pm 0,2206/h$), enquanto que para os produtos secos contendo tioconazol, foi biexponencial, não diferindo dos produtos secos apresentados no capítulo 1 (preparados a partir de nanocápsulas de PCL). Ainda, os perfis de liberação foram semelhantes e isto pode ser evidenciado pelas concentrações de fármaco nos sistemas, no qual 55 % do fármaco se encontra adsorvido ou independentemente livre no sistema para ambos os pós (independente do adjuvante empregado) e 46 % e 45 % do fármaco está no interior das nanocápsulas ($p > 0,05$). Quanto à modelagem utilizando o modelo da Lei das Potências, os produtos secos apresentaram valores de 0,55 e 0,49 para NC_E-TIO-S_{LAC} e NC_E-TIO-S_{TREA}, respectivamente, indicando um transporte anômalo (não Fickiano).

Adicionalmente, comparando-se os perfis de liberação do tioconazol a partir dos produtos secos obtidos pela secagem por aspersão das nanocápsulas de PCL (NC_P-TIO-S, capítulo 1) e das nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 (NC_E-TIO-S_{LAC}, capítulo 2), utilizando a lactose como adjuvante, se verificou um menor percentual de liberação do fármaco após 48 horas para NC_P-TIO-S (53 % em relação à NC_E-TIO-S_{LAC}, a qual demonstrou 68 % de liberação do fármaco) (Figura 1).

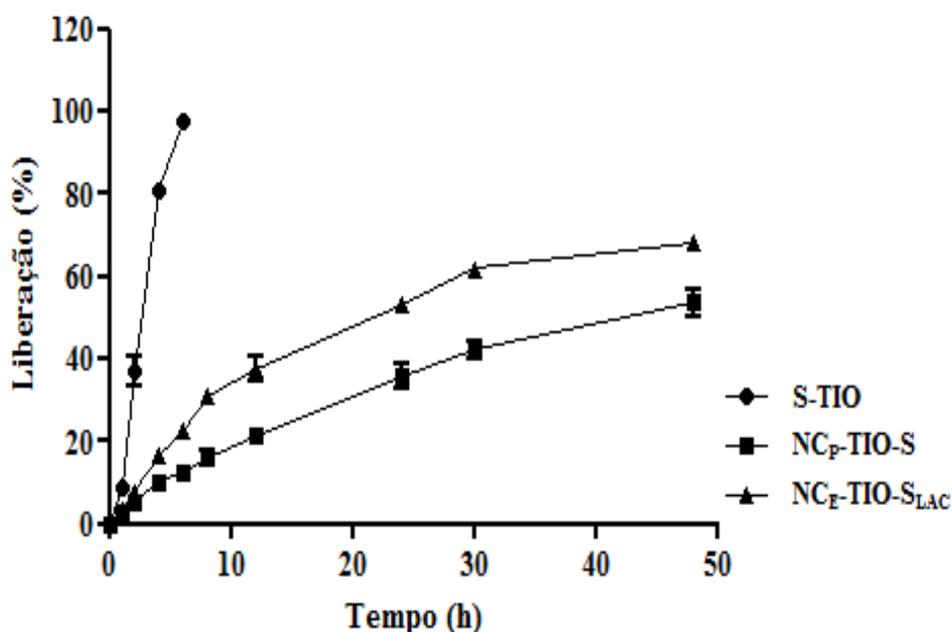


Figura 1. Perfis de liberação *in vitro* dos produtos secos contendo tioconazol por *spray-drying* (NC_p-TIO-S e NC_E-TIO-S_{LAC}) e da solução metanólica (S-TIO).

Além disso, de acordo com o modelo apresentado (segunda ordem), as concentrações de fármaco que se encontram dentro das nanopartículas foram de 79 % e 46 %, enquanto que 20 % e 55 % do fármaco estão adsorvidos ou independentemente livres no sistema para os produtos secos de NC_p-TIO-S e NC_E-TIO-S_{LAC}, respectivamente, demonstrando que a utilização de diferentes polímeros pode ter afetado a associação do fármaco nas nanoestruturas. Estas diferenças podem estar relacionadas às características dos polímeros. O Eudragit[®] RS100 é um polímero amorfo (THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013) e a PCL possui estrutura semicristalina; polímeros com estruturas cristalinas possuem um maior grau de empacotamento molecular e, com isto, tendem a maior resistência à difusão do fármaco em relação a polímeros com características amorfas (OLIVEIRA; LIMA, 2006). Além disso, as diferenças no perfil de liberação dos produtos secos também podem estar relacionadas à melhor eficiência de encapsulamento do fármaco verificada para as nanocápsulas de PCL, contribuindo para uma liberação mais lenta do mesmo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- A associação do tioconazol às nanocápsulas poliméricas de PCL e Eudragit® RS100 foi satisfatória e as formulações apresentaram características físico-químicas adequadas: tamanho nanométrico de partículas, compatível com o método de preparação utilizado, índice de polidispersão abaixo de 0,20 e teor de fármaco próximo ao teórico. Além disso, as formulações foram estáveis por um período de 30 dias.
- A secagem por aspersão e a liofilização possibilitaram a obtenção de produtos secos a partir das nanocápsulas e nanoemulsões contendo o fármaco em estudo, utilizando a lactose e a trealose como adjuvantes, na proporção de 10 % (m/v). Independente do método de desidratação e do adjuvante, os produtos secos apresentaram características físico-químicas satisfatórias quanto ao rendimento, teor e umidade. Além disso, apresentaram boa redispersão em água, sendo possível verificar a presença de partículas nanométricas e micrométricas (por difração a laser), e a retomada do tamanho nanométrico semelhante à formulação líquida original, após filtração, na análise por espectroscopia de correlação de fótons. A análise morfologia dos pós demonstrou a presença de partículas arredondadas para as desidratadas por *spray-drying* e irregulares para as obtidas por liofilização.
- Os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas de PCL apresentaram estabilidade a temperatura ambiente no que se refere ao tamanho e teor de fármaco; no entanto, os produtos secos obtidos a partir de nanoemulsões e nanocápsulas de Eudragit® RS100, por *spray-drying* e lactose como adjuvante, mostraram-se instáveis após 30 dias de preparação, devido, provavelmente, ao efeito do calor, observando-se uma diminuição do teor de fármaco.
- As suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol apresentaram atividade antifúngica frente à levedura de *C. albicans*, da mesma forma que os produtos secos originados a partir destas formulações, demonstrando que os processos de desidratação (a quente e a frio) utilizados não afetaram a ação antifúngica do fármaco.
- A avaliação de liberação *in vitro* do fármaco demonstrou que os produtos secos a partir de suspensões de nanocápsulas foram capazes de promover o controle de liberação do tioconazol, independente do adjuvante e do processo de desidratação utilizado. Todas as formulações apresentaram modelo biexponencial, enquanto que o fármaco livre apresentou cinética de ordem zero.
- Os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas de PCL por *spray-drying* apresentaram maior controle na liberação do tioconazol no tempo de 48 horas.

- A utilização de trealose como adjuvante na desidratação de nanocápsulas poliméricas de Eudragit[®] RS100 por *spray-drying* se mostrou promissora, uma vez que possibilitou uma adequada redispersão dos pós em água e conferiu estabilidade ao fármaco em comparação à lactose. Além disso, mudanças no perfil de liberação do fármaco não foram observadas.
- No que se refere aos processos de desidratação utilizados neste trabalho, a secagem por aspersão de nanocápsulas de PCL poderia ser o método de escolha, uma vez que possibilitou um maior controle na liberação do fármaco em estudo, além de ser uma técnica rápida e de fácil transposição de escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006a.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87-94, 2006b.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006c.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 74-82, 2006d.

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, p. 215-220, 2007.

ARTNER, J.; FUCHS, G. Open studies of the efficacy, tolerance, systemic absorption and vaginal persistence following single application of tioconazole ointment in the treatment of patients with vaginal candidiasis. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, v. 23, p. 12-19, 1983.

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.

AUVILLAIN, M.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S.T.P. Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 738-744, 1989.

BARZEGAR-JALALI, M.; ALAEI-BEIRAMI, M.; JAVADZADEH, Y.; MOHAMMADI, G.; HAMIDI, A.; ANDALIB, S.; ADIBKIA, K. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium-eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. **Powder Technology**, v. 219, p. 211-216, 2012.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BENVENUTTI, E. V.; DALLA COSTA, T. C.; GUTERRES, S. S. Nanostructure-coated diclofenac loaded microparticles: preparation, morphological characterization, *in vitro* release an *in vivo* gastrointestinal tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1233-1240, 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.

BECK, R. C. R.; OURIQUE, A. F.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, p.195-208, 2012.

BEIROWSKI, J.; INGHELBRECHT, S.; ALBERTINA, A.; GIESELER, H. Freeze-Drying of nanosuspensions, 1: Freezing rate versus formulation design as critical factors to preserve the original particle size distribution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 1958-1968, 2010.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A. C. C.; JAGER, E.; MORRONE, F. B.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1104-1111, 2009.

BHARDWAJ, S. P.; SURYANARAYANAN, R. Molecular mobility as an effective predictor of the physical stability of amorphous trehalose. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3209-3217, 2012.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

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.

CERDEIRA, A. M.; MAZZOTTI, M.; GANDER, B. Formulation and drying of miconazole and itraconazole nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, p. 209-220, 2013.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 671-675, 2004.

CHACON, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 99-107, 1999.

CHEC RESEARCH CENTRE. **About CHEC**. Dinamarca, 2007. Disponível em: <<http://www.chec.kt.dtu.dk/About%20CHEC.aspx>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

CHOI, M. J.; BRIANÇON, S.; ANDRIEU, J.; MIN, S. G.; FESSI, H. Effect of freeze-drying process conditions on the stability of nanoparticles, **Drying Technology**, v. 22, p. 246-335, 2004.

CHUNG, N. O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, p. 42- 50, 2012.

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.

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

DE CHASTEIGNER, S., FESSI, H., CAVÉ, G., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 5, p. 242-246, 1995.

DE DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 3, p. 33-39, 2011.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 1966-1972, 2008.

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

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FINCH, J. J.; WARSHAW, E. M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatologic Therapy*, v. 20, p. 31-46, 2007.

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 essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FLORES, F. C.; DE LIMA, J. A.; RIBEIRO, R. F.; ALVES, S. H.; ROLIM, C. M.; BECK, R. C.; SILVA, C. B. 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.; 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.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 616-621, 2010.

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

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GROVER, C.; KHURANA, A. An update on treatment of onychomycosis. **Mycoses**, v. 55, p. 541-551, 2012.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 353-367, 2008.

GUTERRES, S. S.; MÜLLER, C. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastrointestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

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.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.

HAY, R. J.; MACKIE, R. M.; CLAYTON, Y. M. Tioconazole nail solution: an open study of its efficacy in onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 10, 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.

HEIKKILA, H.; STUBB, S.; REITAMO, R. 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.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, p. 1-13, 2012.

ISLAM, M. I. U.; LANGRISH, T. A. G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, v. 43, p. 46-56, 2010.

JAFARINEJAD, S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; GHAZI-KHANSARI, M.; NAJAFABADI, A. R.; MOHAJEL, N. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. **Powder Technology**, v. 222, p. 65-70, 2012.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDINI, 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, 2009.

JENSEN, D. M. K.; CUN, D.; MALTESEN, M. J.; FROKJAER, S.; NIELSEN, H. M.; FOGED, C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 138-145, 2010.

JERVONS, S., GYMER, G. E.; BRAMMER, K. W.; COX, D. A.; LEMMING, M. R. G. Antifungal activity of tioconazole (uk-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, p. 597-602, 1979.

JONES, R. N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIN, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (Vagistat-1 6.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.17, p. 45-51, 1993.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, p. 6646-6655, 2012.

KAMIYA, S.; NOZAWA, Y.; MIYAGISHIMA, A.; KURITA, T.; SADZUKA, Y.; SONOBE, T. Physical characteristics of freeze-dried griseofulvin-lipids nanoparticles. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 181-184, 2006.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 631-644, 2007.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, p.254-259, 2012.

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.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVE, U.; LUENGO, J.; WEIB, B.; SCAHEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticle – An efficient carrier of drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutis e Biopharmaceutics**. v. 66 p. 150-164, 2007.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHANZER, S.; KNORR, F.; MEINKE, M.; STERRY, W.; PATZELT, A. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 465-468, 2011.

LUYCKX, J.; BAUDOUIN, C. Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. **Clinical Ophthalmology**, v. 5, p. 577-581, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MAHESH, V. C.; POPESCU, C. Conversion of nanosuspensions into dry powders by spray drying: a case study. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2302-2308, 2008.

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.

MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2059-2067, 2012.

MARRIOTT, M. S.; BAIRD, J.R.C.; BRAMMER, K.W.; FAULKNER, J. K.; HALLIWELL, G.; JEVONS, S.; TARBIT, M. H. Tioconazole, a new imidazole-antifungal agent for the treatment of dermatomycoses. **Antifungal and pharmacologic properties Dermatology** v. 116 p. 1-7, 1983.

MIKOSZFERA RESEARCH E DEVELOPMENT LTD. **Exhibitions**. Hungria, 2007.

Disponível em:

<http://www.mikoszfera.hu/en/index.php?m=menu&s=mushroom_mummies>. Acesso em: 20 mar. 2013.

MISHRA, B.; BHAVESH, P. B.; TIWARI S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications 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, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343-347, 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.

NAKAGAWA, K.; SURASSMO, S.; MIN, S. G.; CHOI, M. J. Dispersibility of freeze-dried poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 177-188, 2011.

NIKAM, V. K.; KOTADE, K. B.; GAWARE, V. M.; DOLAS, R. T.; DHAMAK, K. B.; SOMWANSHI, S. B.; KHADSE, A. N.; KASHID, V. A. Eudragit a versatile polymer: A Review. **Pharmacologyonline**, v. 1 p. 152-164, 2011.

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.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637-652, 2008.

OBACH, E. S. **Avaliação dos perfis de liberação *in vitro* e da toxicidade gastrointestinal *in vivo* de indometacina a partir de nebulizados de nanopartículas**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ODDS F. C., WEBSTER C. E., ABBOTT A. B. Antifungal relative inhibition factors: BAY 1-9139, bifonazole, butoconazole, isoconazole, itraconazole (R 51211), oxiconazole, Ro 14-4767/002, sulconazole, terconazole and vibunazole (BAY n-7133) compared *in vitro* with nine established antifungal agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 14, p. 105-114, 1984.

ÓGÁIN, O. N.; LI, J.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I—Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 23-35, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 29-35, 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.

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

PERUMAL, D.; DANGOR, C. M.; ALCOCK, R. S.; HURBANS, N.; MOOPANAR, K. R. Effect of formulation variables on *in vitro* drug release and micromeritic properties of modified release ibuprofen microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 475-487, 1999.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 53-61, 2002.

PIKAL, M.J.; SHAH, S.; ROY, M.L.; PUTMAN, R. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, p. 203-217, 1990.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanosphers: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

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 gastrintestinal 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.

RÉ, M-I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, p. 433-446, 2006.

REBOUÇAS, J. S.; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; ESPARZA, I.; POZO, V.; SANZ, M. L.; FERRER, M.; GAMAZO, C. Development of poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins: the influence of preparation method on the immunogenic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 241-249, 2012.

RUBIO, M. C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J. G.; RUESCA, R. B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.16, p. 16-22, 1999.

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.

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. 26, n. 5, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 505-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SHABDE, V.S.; HOO, K.A. Design and Operation of a Spray Dryer for the Manufacture of Hollow Microparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8329-8337, 2006.

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.

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.

SINDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: SINDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004, cap. 6, p. 57.

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.

STUBB, S.; HEIKKILÄ, H.; REITAMO, S.; FÖRSTRÖM, L. Contact allergy to tioconazole. **Contact Dermatitis**, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

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

TANG, X.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 191-200, 2004.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 63-74, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p. 124-135, 2007.

THAKRAL, S.; THAKRAL, N. K.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit: a technology evaluation. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, p. 131-149, 2013.

TOMODA, K.; OHKOSHI, T.; KAWAI, Y.; NISHIWAKI, M.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: Effects of the temperature at a spray-dryer inlet upon the properties of particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, p. 138-144, 2008.

USP 32. The United States Pharmacopeia. 32th. ed. Rockville: Unites States Pharmacopeial Convention, 2009.

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

VANDEN, B. H.; MARICHAL, P.; ODDS F. C. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 393-400, 1994.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.

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.

WESSMAN, P.; EDWARDS, K.; MAHLIN, D. Structural effects caused by spray- and freeze-drying of liposomes and bilayer disks. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2032-2048, 2010.

YADAV, K. S.; SAWANT, K. K. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1456-1465, 2010.

ZHANG, W.; RONG, J.; WANG, Q.; HE, X. The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule. **Nanotechnology**, v. 20, p. 275101 (14pp), 2009

ZHAO, Y.; BROWN, M. B.; JONES, S. A. Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 227-236, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do tioconazol nos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas por *spray-drying*.

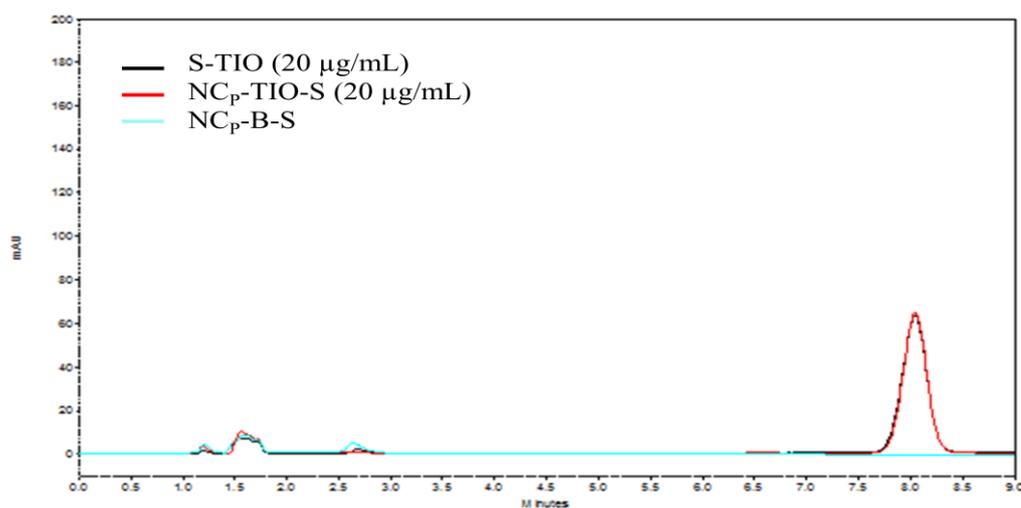


Figura 1- Cromatogramas obtidos por CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC_p-TIO-S (20,0 µg/mL); (C) NC_p-B-S.

Apêndice B – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do tioconazol nos produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas por *spray-drying*, utilizando a lactose e trealose como adjuvantes.

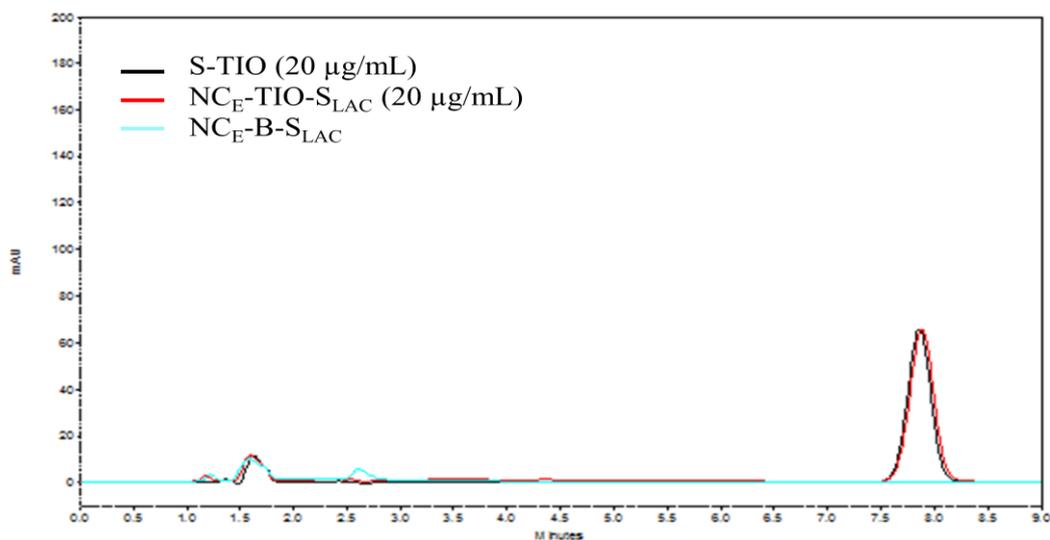


Figura 2- Cromatogramas obtidos por análise em CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC_E-TIO-S_{LAC} (20,0 µg/mL) e (C) NC_E-B-S_{LAC}.

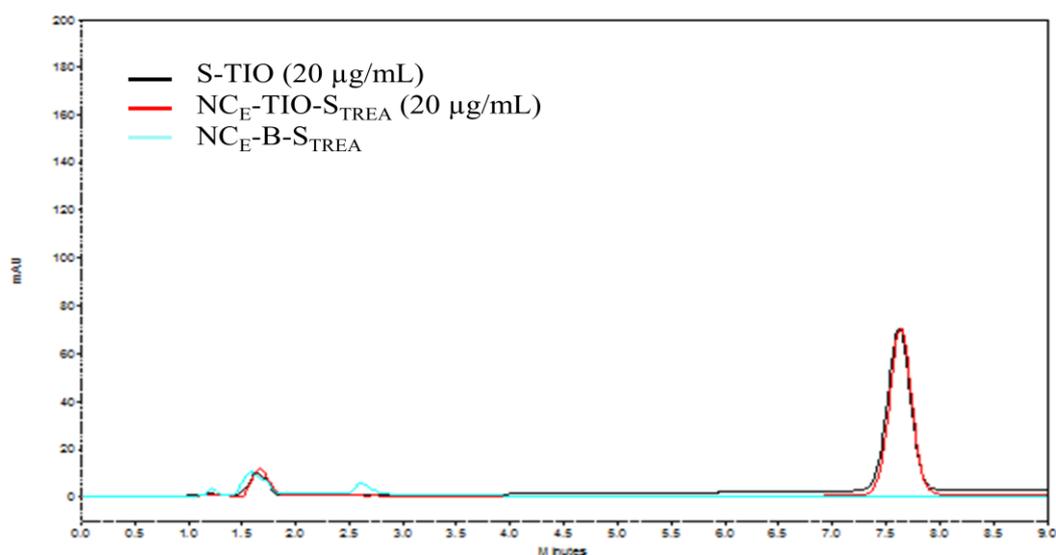


Figura 3- Cromatogramas obtidos por análise em CL. (A) Solução de tioconazol em metanol (20,0 µg/mL); (B) NC_E-TIO-S_{TREA} (20,0 µg/mL) e (C) NC_E-B-S_{TREA}.