

Vanderléia Gava Marini

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
TERPINEN-4-OL**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
doutor em Química
Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi
Coorientador: Prof. Dr. Vanderlei
Gageiro Machado

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marini, Vanderléia Gava

Nanopartículas de zeína: Preparação, caracterização e desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de terpinen-4-ol / Vanderléia Gava Marini ; orientador, Valdir Soldi ; coorientador, Vanderléia Gageiro Machado. - Florianópolis, SC, 2014.
143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Nanopartículas de zeína. 3. Terpinen-4-ol. 4. Permeação cutânea. I. Soldi, Valdir. II. Gageiro Machado, Vanderléia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Vanderléia Gava Marini

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E USO NO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
TERPINEN-4-OL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 10 de março de 2014

Prof. Hugo Gallardo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Valdir Soldi, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Izabel C. Riegel-Vidotti, Dr.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Márcia Meier, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Claudia Sayer, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Betina Zanetti-Ramos, Dr.
Nanovetores Tecnologia

Este trabalho é dedicado às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Valdemir e Aleanez, e minhas irmãs Vanessa, Vânia e Viviane.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande mestre, que nos deu o dom da vida e nos abençoou o saber.

Aos meus pais, Valdemir e Aleanéz, e minhas irmãs, Vanessa, Vânia e Viviane que apesar da distância sempre estiveram me apoiando, confortando e incentivando a prosseguir a jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Minha eterna gratidão, amo vocês.

Ao prof. Dr. Valdir Soldi, orientador deste trabalho, pela dedicação a esta tarefa, pela atenção, confiança e os ensinamentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado pela co-orientação, tendo valiosa contribuição, aconselhamento e por todos os ensinamentos transmitidos.

A profa. Dra. Silvia Martelli, pela amizade, por todas as discussões, ajuda e dedicação durante todo o doutorado, que foram essenciais para o sucesso da realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pelo tempo dedicado à análise deste trabalho e pela importante contribuição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelas conversas, discussões e pelos conhecimentos repassados.

Aos colegas do laboratório Polimat pelas trocas de experiências, em especial, ao Josué, ao Mauro, ao Rodrigo, à Samira e à Tatiane pelas discussões, pela força e amizade.

Ao Thiago pela grande colaboração nos experimentos de permeação.

Ao Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), ao Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC), ao Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC e ao Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV – Grenoble/FR) e pela possibilidade da realização dos estudos de potencial zeta, CLAE, microscopias e SLS/DLS, respectivamente.

À UFSC, a coordenadoria de pós-graduação em química, aos professores e funcionários por terem possibilitado minha formação acadêmica.

Aos meus amigos, aos novos que fiz durante o doutorado e aos mais antigos que estão sempre presentes em meus pensamentos e atitudes.

Aos amigos, Dilamara, Michele, Rafael e Regina, que na distância mantiveram-se ao meu lado sempre, com amor e incentivo.

Ao CNPq, que financiou este trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram, para a concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de nanopartículas (NPs) biodegradáveis, incluindo NPs revestidas com quitosana (CS) e a utilização de promotores de permeação (SPEs), visando a liberação transdérmica do terpinen-4-ol (T4OL). Três diferentes sistemas de NPs foram desenvolvidos: NPs de zeína, NPs de zeína na presença de SPEs e NPs de zeína revestidas com CS. As NPs foram preparadas pela adaptação de um processo de precipitação em antissolvente. Todos os sistemas investigados apresentaram forma esférica e mostraram tamanhos em torno de 200 nm, com uma estreita faixa de distribuição de tamanho. As NPs também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), tendo sido obtidos dados que confirmaram os valores do tamanho obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS). As suspensões de NPs contendo T4OL apresentaram valores de eficiência de encapsulação (EE) próximos a 90%. O revestimento das NPs com CS foi confirmado através das medidas de tamanho das partículas e de potencial zeta (ζ). Foi avaliada a estabilidade das suspensões de NPs de zeína contendo T4OL em função do tempo. As NPs na presença ou ausência de SPEs foram estáveis por até 20 dias, enquanto para as NPs na presença ou ausência de CS a estabilidade foi até o 30^o dia. As NPs de zeína também foram avaliadas quanto à liberação, permeação e retenção de T4OL através da pele de orelha suína, em um modelo da câmara de difusão de Franz. Foi estudado ainda o efeito dos SPEs sobre a permeação cutânea do T4OL contido nas NPs, tendo sido observada uma melhora na permeação do T4OL e que sua liberação ocorre de maneira mais controlada. Os resultados mostram que as NPs de zeína estudadas são sistemas nanoestruturados promissores para a entrega prolongada T4OL, exibindo potencial para ser utilizado em terapia anti - melanoma.

Palavras-chave: nanopartículas de zeína, quitosana, terpinen-4-ol, permeação cutânea, liberação controlada.

ABSTRACT

This study describes the development of biodegradable nanoparticles (NPs), including NPs recovered with chitosan (CS) and the utilization of skin penetration enhancers (SPEs), aiming the T4OL delivery in the skin. Three different NP systems were developed: zein NPs, zein NPs in the presence of SPEs and zein NPs recovered with CS. Zein NPs were prepared using a modified antisolvent precipitation process (desolvation). All investigated systems presented spherical format and showed sizes at ca. 200 nm, with a narrow range of size distribution. The NPs were also characterized through transmission electronic microscopy analysis, being obtained data that confirmed the obtained size values by dynamic light scattering (DLS). The suspensions of NPs containing T4OL presented EE values of ca. 90%. Recovering of NPs with CS was confirmed by means of measurements of size particles and zeta potential (ζ). The stability of zein NPs suspensions were evaluated as a function of the time. The NPs in the absence and in the presence of SPEs were stable until the period of 20th day, while for the NPs in the presence and in the absence of CS the stability occurred until the 30th day. The delivery, permeation and retention of zein NPs T4OL through pig ear skin were also evaluated, using a Franz diffusion cell apparatus. The influence of the SPEs on the cutaneous permeation of T4OL contained in the NPs was also studied, being reported an improved T4OL permeation and that its release occurs in a more controlled fashion. The results show that the zein NPs studied here are promising nanostructured systems for the prolonged T4OL delivery, exhibiting a potential to be used in anti-melanoma therapy.

Keywords: zein nanoparticles, chitosan, terpinen-4-ol, cutaneous permeation, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) princípio ativo adsorvido na parede polimérica das nanocápsulas; c) princípio ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) princípio ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	28
Figura 2 - Folhas da planta <i>Melaleuca alternifolia</i> (Myrtaceae).....	33
Figura 3 - Estrutura química do monoterpene (-) T4OL.....	34
Figura 4 - Estrutura molecular da CS.....	43
Figura 5 - Lesão dos melanócitos nos tecidos cutâneos.....	47
Figura 6 - Estrutura da pele.....	50
Figura 7 - Método da preparação das NPs de zeína.....	58
Figura 8 - Método da preparação das NPs de zeína para encapsulação do T4OL.....	59
Figura 9 - Método da preparação das NPs de zeína para encapsulação do T4OL com revestimento de CS.....	60
Figura 10 - Modelo da câmara de difusão de Franz.....	65
Figura 11 - Câmara de difusão de Franz.....	67
Figura 12 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 5000 rpm.....	71
Figura 13 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 3500 rpm.....	72
Figura 14 - Tamanho e PDI (A) e ζ (B) das NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 500 rpm.....	73
Figura 15 - Tamanho e PDI (A) e ζ (B) das NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 1000 rpm.....	73
Figura 16 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 500 rpm e tempo de gotejamento de 30 min.....	74
Figura 17 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 1000 rpm e tempo de gotejamento de 30 min.....	75
Figura 18 - Influência da composição do solvente (A) no tamanho, (B) no PDI e (C) ζ de NPs de zeína.....	76
Figura 19 - NPs de zeína com diferentes composições do etanol: (a) 65% (b) 70% (c) 75% (d) 80% (e) 85% (f) 87% (g) 90% (h) 95%.....	77
Figura 20 - Variação do tamanho, PDI (A) e ζ (B) em função do pH das NPs de zeína.....	77
Figura 21 - Injeção do T4OL (A) e dos compostos da formulação (B).	79

Figura 22 - Superfícies de resposta obtidas para T4OL com (A) zeína e (B) TTABr.	83
Figura 23 - Micrografias obtidas por TEM das NPs de zeína vazia (A) e com T4OL (B) em maior e menor magnificação.	85
Figura 24 - Micrografias obtidas por TEM das amostras B2 (A) B3 (B) e B4 (C) em maior e menor magnificação.	87
Figura 25 - NPs de zeína com T4OL encapsulado na ausência (B1) e na presença dos SPEs, propilenoglicol (B2), limoneno (B3) e ácido oleico (B4).	89
Figura 26 - Tamanho e ζ das suspensões (■) B1, (●) B2, (▲) B3 e (▼) B4 em relação ao tempo (dias). As suspensões foram mantidas em recipientes de cor transparente a uma temperatura de 25 °C.	90
Figura 27 - PDI em função do tempo (dias) das amostras B1 (■), B2 (■); B3(■) e B4 (■).....	90
Figura 28 - EE no tempo zero (■) e 20 dias (■).	92
Figura 29 - Perfil de liberação do T4OL na presença e ausência dos promotores de permeação em membrana de acetato de celulose.	93
Figura 30 - Perfis de permeação do T4OL através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações (média \pm SD, n = 3).	96
Figura 31 - Porcentagem de T4OL retida na derme e na epiderme após 10 horas. Média \pm SD (n = 3). Utilizaram-se os testes ANOVA/Tukey (p < 0,05).	98
Figura 32 - Variação do tamanho, PDI (A) e ζ (B) em função do pH das NPs de zeína(5 mg mL ⁻¹) carregadas com T4OL.	102
Figura 33 - Variação do ζ (mV) em função da razão [CS]/[zeína]. ...	106
Figura 34 - Variação do PDI (A) e tamanho (B) em função da razão [CS]/[zeína].	106
Figura 35 - Imagens de TEM das NPs de zeína carregado com T4OL na ausência de CS (A) e na presença de CS (B).	107
Figura 36 - Função de correlação $g_2(q, t) - 1$ em ângulos de espalhamento de 90°, 60° e 120° e a distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° (A) A1 e (B) A3.	109
Figura 37 - Micrografias para as NPs de zeína (A1) (A e B) em maior e menor magnificação.	109
Figura 38 - Gráfico de Guinier para a dependência angular da intensidade de SLS (A); dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do DLS (B) e micrografia obtida por TEM (C). Obtidos para a amostra A3.	110
Figura 39 - Função de correlação $g_2(q, t) - 1$ em ângulos de espalhamento de 60° , 90° e 120° e a distribuição dos tempos de relaxação obtidos a 90° (A) A4 e (B) A5.	111

Figura 40 - Micrografias obtidas por TEM das amostras A4 (A) e A5(B).....	112
Figura 41 - EE do T4OL em NPs de zeína.....	114
Figura 42 - Tamanho e ζ das suspensões (■)A3, (●) A4 e (▲) A5 em relação ao tempo(dias) mantidos em recipientes de cor transparente a uma temperatura de 25°C.....	117
Figura 43 - PDI em função do tempo (dias) das amostras A3 (■); A4 (□) e A5 (■).	117
Figura 44 - EE no tempo zero (■) e 30 dias (□).	119
Figura 45 - Perfil da liberação <i>in vitro</i> do T4OL na presença e ausência de CS (média \pm DP, $n = 3$).	120
Figura 46 - Perfis de permeação do T4OL através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações (média \pm SD, $n = 3$).	121
Figura 47 - Porcentagem de T4OL retida na derme e na epiderme após 10 horas. Média \pm SD ($n = 3$). Utilizaram-se os testes ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de ρ e a morfologia das partículas (CRISTIANO GIACOMELLI, 2006).....	112
Tabela 2 - Aminoácidos constituintes da zeína. O grupo R, característico de cada aminoácido, está destacado em vermelho (LEHNINGER, 1980; SHUKLA; CHERYAN, 2001).Esta tabela não está legal, acho que vc poderia usar um editor de estruturas, como o Isisdrawn e construí-las.....	39
Tabela 3 - Composição das NPs de zeína.....	60
Tabela 4 - NPs de zeína estabilizada com diferentes surfactantes.....	78
Tabela 5 - Fatores, níveis e respostas para planejamento fatorial fracionário 3^{3-1}	81
Tabela 6 - Resultados obtidos do planejamento fatorial fracionário 3^{3-1}	82
Tabela 7 - Influência do T4OL no tamanho, PDI, ζ e EE na formação das NPs de zeína.....	84
Tabela 8 - Influência dos diferentes promotores de permeação no tamanho, PDI, ζ e EE na formação das NPs de zeína.....	86
Tabela 9 - Determinação do pH durante os 30 dias de experimento. ...	91
Tabela 10 - Coeficiente de correlação (R^2) dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.....	93
Tabela 11 - Parâmetros de permeação dos diferentes sistemas com T4OL ($n = 3$).	97
Tabela 12 - Efeito da concentração de zeína em relação aos tamanhos das NPs de zeína carregadas com T4OL.	100
Tabela 13 - Valores referentes à caracterização físico-química das suspensões contendo nanoesfera de zeína na presença e ausência do T4OL.	103
Tabela 14 - Características dos sistemas determinados por DLS e SLS.	113
Tabela 15 - Determinação do pH durante os 45 dias de experimento.	118
Tabela 16 - Parâmetros de permeação dos diferentes sistemas com T4OL ($n = 3$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária
CLAE - Cromatógrafo líquido de alta eficiência
CMCS - Carboximetilquitosana
CS - Quitosana
DHC - 6,7-dihidroxicoumarina
DLS - Espalhamento de luz dinâmico
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DTABr - brometo *n*-dodecil trimetilamônio
EE - Eficiência de encapsulação
EOs - Óleos essenciais
FDA - Food and Drug Administration
HL-60 - Células de leucemia promielocítica de humanos
HTABr - brometo *n*-hexadecil trimetilamônio
INCA - Instituto Nacional do Câncer
MWCO - Molecular weight cut- off
NPs - Nanopartículas
PBS - Tampão fosfato salino
PCS - Prociamidinas cranberry
PDI - Índice de polidispersidade
PEG - Polietilenoglicol
PI - Ponto isoelétrico
PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico)
F68 - Pluronic F-68
R - Coeficiente de correlação
R_H - Raio hidrodinâmico
R_f - Função de resposta
R_g - Raio de giração
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SDSPAGE - Eletroforese em gel de poli(acrilamida)
SLS - Espalhamento de luz estático
SPEs - Promotores de permeação
SPI - Proteína isolada de soja
SNC - Sistema nervoso central
TEM- Microscopia eletrônica de transmissão
TOC - α -tocoferol
TTABr - Brometo de *n*-tetradeciltrimetilamônio
TTO - Tea tree oil
T4OL- Terpinen-4-ol
T80 - Tween 80

UV - Radiação ultravioleta
VD3 - Vitamina D3
 Γ - Frequência de relaxação
 λ - Comprimento de onda
 ζ - Potencial zeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1.1 Nanopartículas Poliméricas	27
1.1.1.1 <i>Polímeros biodegradáveis</i>	29
1.1.1.2 <i>Estabilidade e caracterização das nanopartículas</i>	30
1.1.2 Terpinen-4-ol	32
1.1.3 Zeína	37
1.1.3.1 <i>Histórico</i>	37
1.1.3.2 <i>Composição e estrutura</i>	38
1.1.3.3 <i>Características</i>	39
1.1.3.4 <i>Algumas aplicações da zeína</i>	39
1.1.4 Quitosana	43
1.1.5 Câncer	44
1.1.5.1 <i>Aspectos Gerais</i>	44
1.1.5.2 <i>Câncer de pele</i>	46
1.1.6 Pele	49
1.1.6.1 <i>Anatomia, histologia e fisiologia</i>	49
1.1.6.2 <i>A pele como via de administração</i>	51
1.2 OBJETIVOS.....	55
1.2.1 Objetivo Geral	55
1.2.2 Objetivos Específicos	55
2 MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1 MATERIAIS.....	57
2.2 METODOLOGIA.....	58
2.2.1 Otimização do experimento para obtenção de NPs de zeína	58
2.2.2 NPs de zeína com encapsulação do T4OL na presença e ausência de promotores de permeação (SPEs)	58
2.2.3 NPs de zeína com encapsulação do T4OL e/ou revestida com quitosana	59

2.2.4	Determinação da EE do T4OL nas suspensões de NPs.....	60
2.2.5	Curva de calibração para determinação da concentração do T4OL.....	61
2.2.6	Doseamento do T4OL nas suspensões aquosas de NPs.....	61
2.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	61
2.3.1	Determinação do tamanho e PDI das NPs.....	62
2.3.2	Determinação do ζ das NPs.....	62
2.3.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	62
2.3.4	Determinação do pH.....	63
2.3.5	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS).....	63
2.4	ESTUDO DA ESTABILIDADE CINÉTICA DAS SUSPENSÕES.....	64
2.5	LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	64
2.5.1	Estudo de liberação <i>in vitro</i> do T4OL.....	64
2.5.2	Estudos de permeação e retenção cutânea do T4OL.....	65
2.5.3	Análise estatística.....	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1	NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA.....	70
3.1.1	Otimização do experimento para obtenção de NPs de zeína.....	70
3.1.2	Efeito do solvente na preparação das NPs de zeína.....	75
3.1.3	Influência do pH na preparação das NPs.....	77
3.1.4	Influência do surfactante.....	78
3.2	NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM PROMOTORES DE PERMEAÇÃO PARA LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO TERPINEN-4-OL.....	79

3.2.1	Teste de especificidade.....	79
3.2.2	Construção da curva de calibração.....	80
3.2.3	Caracterização Físico-Química das NPs.....	80
3.2.4	NPs de zeína com encapsulação do T4OL na presença dos SPEs.....	85
3.2.5	Estudo da estabilidade cinética das suspensões.....	87
3.2.6	Liberação <i>in vitro</i>	92
3.2.7	Permeação e retenção cutânea.....	95
3.3	NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO DO TERPINEN-4-OL.....	99
3.3.1	Caracterização Físico-Química das NPs.....	99
3.3.2	NPs de zeína revestidas com quitosana.....	104
3.3.3	Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS).....	108
3.3.4	Determinação da EE do T4OL nas suspensões de NPs.....	113
3.3.5	Estudo da estabilidade cinética das suspensões.....	115
3.3.6	Liberação <i>in vitro</i>	119
3.3.7	Permeação e retenção cutânea.....	120
	CONCLUSÕES.....	125
	REFERÊNCIAS.....	127

INTRODUÇÃO

O objetivo há muito tempo desejado de direcionar os fármacos para locais específicos no corpo humano, onde a ação farmacológica é desejada, poupando outros tecidos, tem sido perseguido ativamente durante os últimos anos, e os recentes avanços da nanotecnologia têm proporcionado desenvolvimentos significativos nesta área. De uma forma genérica, a nanotecnologia refere-se a um campo da ciência e da tecnologia aplicada, no qual o controle da matéria é efetuado em nível molecular.

De fato, as recentes investigações na área de nanopartículas (NPs) para aplicações na área biomédica têm-se baseado na premissa de que estes nanomateriais podem ser sintetizados e funcionalizados de forma a atingirem o local desejado.

A zeína tem sido extensivamente investigada pela sua capacidade de formar NPs por auto-associação para encapsulação de compostos bioativos. Também têm sido desenvolvidas partículas nanométricas que podem ser usadas para liberação controlada de fármacos com aplicação biomédica, no qual, tem demonstrado um bom potencial de liberação tanto *in vitro* como *in vivo* (PATEL, 2010; LAI, 2011; LUO *et al.*, 2010; REDDY; YANG, 2011).

O câncer de pele é o mais frequentemente desenvolvido pela população brasileira, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores diagnosticados em todas as regiões geográficas do país. (RICOTTI, 2009).

Numerosos fatores de risco estão associados com o desenvolvimento de câncer de pele. Estes incluem a exposição à radiação ultravioleta (UV), fatores fenotípicos, tais como o tipo de pele, cores dos olhos e do cabelo, a tendência para queimar ao invés de bronzear, a presença de sardas e pintas, predisposição genética e exposição prolongada crônica à radiação solar, por exemplo, em marinheiros e em agricultores (CUMMINGS, 1997).

O câncer de pele do tipo melanoma representa uma pequena porcentagem de 4%, sendo a principal causa de morte por doença de pele. Caracteriza-se pela alta capacidade de infiltração no sistema nervoso central (SNC), com predominância em adultos brancos (POPIM, 2008). O prognóstico de pacientes com melanoma metastático é desfavorável, com sobrevida média de oito a nove meses. Relatos de várias partes do mundo demonstram um crescente aumento na sua taxa de incidência (4 a 8%), sendo o maior aumento registrado no período de 2004 e 2005, de aproximadamente 9% (RICOTTI, 2009).

Atualmente, não se tem medicação de uso tópico comercial para o melanoma, embora exista uma grande disponibilidade de tratamentos

convencionais com fármacos quimioterápicos e/ou compostos imunoterápicos e hormonais, porém, os mesmos não têm sido eficientes quanto à busca de melhorias clínicas significativas. A principal causa é a perda da eficácia dos fármacos ao longo do tratamento, uma vez que as células de melanoma, por exemplo as do tipo B16F10, desenvolveram diversos mecanismos de resistência. Por esta razão, a pesquisa por novos agentes antitumorais é crescente.

Os compostos naturais tais como os originados de recursos genéticos vegetais biologicamente ativos, têm atraído a atenção de pesquisadores em busca da cura para diversas doenças. Notadamente a medicina popular vem direcionando estudiosos na procura por novos fitoterápicos. A *Melaleuca alternifolia* (família: Myrtaceae), é uma planta de origem australiana comumente conhecida como a *árvore de chá*. O principal produto dela extraído é o seu óleo essencial (TTO - tea tree oil), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas. Atualmente, o TTO é empregado como agente antimicrobiano ou preventivo em escala farmacêutica ou cosmética e a sua indicação vai desde a utilização tópica em lesões, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas e cremes para a pele e até dentifrícios (Oliveira, *et al.*, 2011).

O terpinen-4-ol (T4OL) é principal componente do TTO, representando aproximadamente 40% da composição do óleo essencial. Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram eficácia da *Melaleuca alternifolia* e do (+)-T4OL na inibição das células M14 do melanoma (Calcabrini, Stringaro, Toccaceli, Meschini, Marra, Colone, *et al.*, 2004; Maccari, 2011). Outros autores demonstraram elevada citotoxicidade da *Melaleuca alternifolia* em células cancerígenas do pulmão (A549), mama (MCF-7) e próstata (PC-3) (Xia L *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foram preparadas e caracterizadas NPs de zeína, que num segundo momento foram utilizadas para o desenvolvimento de um sistema de liberação de T4OL. Com o objetivo de compreender a fundamentação teórica que cerca o presente trabalho, é apresentado a seguir uma revisão bibliográfica sobre tema em estudo.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais que têm recebido considerável atenção nos últimos anos, particularmente aquelas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis (CUVREUR, 1995). As partículas obtidas podem ser na forma de nanoesferas e nanocapsulas e são obtidas pela auto-associação de polímeros que varia geralmente de 10 a 1000 nm (QUINTANAR-GUERRERO, 1998; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Os sistemas coloidais poliméricos por apresentarem distinta composição interna, permitem a encapsulação de princípios ativos com características físico-químicas bem diferenciadas, desde moléculas altamente hidrofóbicas a princípios ativos hidrofílicos (QUINTANAR-GUERRERO, 1998).

A principal vantagem da nanoencapsulação é a obtenção de ação prolongada, ou controlada, do princípio ativo incorporado ou encapsulado. Outras vantagens na utilização de sistemas poliméricos para a encapsulação de fármacos ou ativos cosméticos incluem em mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas, facilitar sua absorção ou penetração cutânea e redução do número de administração (REDDY; YANG, 2011).

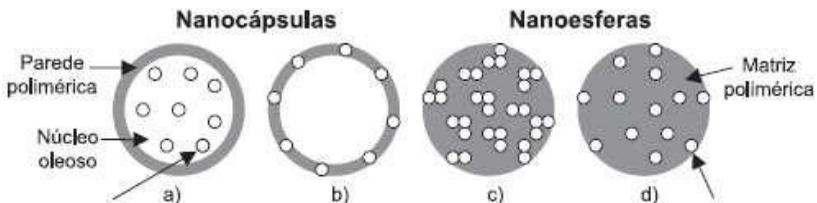
Os sistemas nanoparticulados carreadores de fármacos têm sido focalizados principalmente por permitir a otimização da velocidade controlada e do regime de dosagem das substâncias. As NPs, constituídas por polímeros biodegradáveis, quando comparadas com outros sistemas coloidais, como lipossomas, apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e em condições de armazenamento devido as matérias-primas empregadas na sua produção, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento. Além disso, seus métodos de preparação possibilitam a produção em escala industrial (BÉDARD *et al.*, 2010; MARCHESSAULT, 2005).

Estes tipos de sistemas apresentam-se como carreadores de fármacos e têm apresentado uma melhora na seletividade e eficiência das formulações. Sistemas nanoestruturados estão sendo propostos como carreadores coloidais, usados para liberar vários fármacos na pele e no estrato córneo. Uma liberação controlada do fármaco poderá suprir a pele por um período de tempo mais prolongado, podendo-se também considerar que um tratamento no local afetado é capaz de reduzir a absorção sistêmica e os efeitos colaterais (CUVREUR, 2002).

Em virtude de todo este quadro, há um corrente interesse na utilização de NPs poliméricas. NPs, nanoesferas e nanocápsulas (Figura 1) podem ser preparadas de acordo com a composição e o processo utilizado. As nanocápsulas são constituídas por uma película polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo incorporar o ativo diretamente no núcleo e/ou por adsorção na parede polimérica. São chamados de sistemas do tipo reservatório, onde é possível identificar um núcleo diferenciado. Por outro lado, as nanoesferas constituem um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado. Neste caso, o fármaco encontra-se homogêneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (BÉDARD *et al.*, 2010; KIM, J.; VAN DER BRUGGEN, 2010; SANTOS, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanoesferas e nanocápsulas são preferidos sobre os filmes e micropartículas para a entrega do fármaco e outras aplicações médicas porque os materiais nanométricos correspondem a tamanhos característicos de unidades funcionais naturais em organismos vivos, o que permite que as NPs sejam capazes de interagir com as biomoléculas. Devido ao seu tamanho adequado, as NPs podem difundir no tecido e são geralmente feitas de forma eficiente pelas células proporcionando uma oportunidade para a entrega efetiva de agentes terapêuticos (REDDY; YANG, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) princípio ativo adsorvido na parede polimérica das nanocápsulas; c) princípio ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) princípio ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As NPs podem apresentar sítios de reconhecimento celular na sua superfície e encapsular substâncias ativas (fármacos, aromas e partículas magnéticas). A liberação do princípio ativo pode ocorrer por difusão gradativa através da matriz (sistema matriciais) ou pela degradação da

matriz (sistemas reservatórios) mediante algum estímulo químico ou físico, tais como mudanças de pH, força iônica, temperatura, pressão, atrito, umidade, etc (BÉDARD *et al.*, 2010; GAUCHER *et al.*, 2005).

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de micro e nanopartículas. Entretanto, o método de obtenção de partículas representa um fator crucial para as suas características físico-químicas como distribuição de tamanho e morfologia, o que, em contrapartida, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação de princípios ativos. A metodologia escolhida para obtenção é de extrema importância para controlar a cinética e termodinâmica do processo. Dentre os métodos empregados para a preparação de NPs pode-se mencionar: 1) coacervação; 2) emulsão seguida da evaporação 3) secagem por aspersão; 4) processo dispersão líquido - líquido e 5) processo de precipitação em antissolvente (dessolvatação) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Apesar de extensa pesquisa e desenvolvimento, apenas algumas NPs de entrega de fármacos atualmente são aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) e disponíveis para o tratamento do câncer. Duas formulações de lipossomas comerciais estão disponíveis nos Estados Unidos. O Doxil (Caelyx) e Dauno Xome são os primeiros medicamentos anticâncer revestidos por lipossoma aprovados pela FDA, e estão disponíveis no mercado. Uma terceira formulação lipossomal foi aprovada na Europa para tratamento de câncer de mama, o Myocet. Também foram desenvolvidas NPs de paclitaxel aderido à albumina, sendo a formulação aprovada pelo FDA para o tratamento de câncer de mama (CARUTHERS; WICKLINE; LANZA, 2007; HALEY; FRENKEL, 2008).

Estes exemplos mostram a importância da expansão do campo de desenvolvimento de NPs como vetores para a entrega de fármacos terapêuticos em oncologia e como essa metodologia pode quebrar algumas das barreiras fisiológicas e farmacológicas para o tratamento eficaz contra o câncer (HALEY; FRENKEL, 2008).

1.1.1.1 Polímeros biodegradáveis

Uma classe de polímeros de interesse crescente são os biodegradáveis, que vêm se destacando cada vez mais, devido à busca por um material com durabilidade em uso e degradabilidade após o descarte. Tais materiais vêm sendo muito aplicados na área médica (fios de sutura, implantes, sistema de liberação controlada de fármacos, enxerto vascular, etc) em decorrência de sua biocompatibilidade, capacidade de dissolução no

interior do organismo e propriedades mecânicas adequadas a tais aplicações (AHMED O. ELZOGHBY, 2012; FIALHO *et al.*, 2003).

Vários polímeros naturais e sintéticos têm sido explorados para desenvolver biomateriais para engenharia de tecidos e a entrega de fármacos. As proteínas são preferidas sobre os polímeros sintéticos para aplicações médicas, pois são bio- e citocompatíveis, biodegradáveis, sem toxicidade, abundantes, de custo relativamente baixo e ao mesmo tempo, são hidrofóbicas e insolúveis em água. Além disso, como materiais de suporte para o crescimento celular, é mais fácil manter as funções da matriz extracelular com proteínas do que com polímeros sintéticos (GÓMEZ-MARTÍNEZ; ALTSKÄR; STADING, 2012). Adicionalmente, as proteínas possuem grupos funcionais (carboxila, amino) que possibilitam a modificação da superfície (alteração das cargas) dependendo do pH. Portanto as proteínas podem ser facilmente moduladas para responder aos diferentes valores de pH do meio para liberação de vários tipos de produtos farmacêuticos (REDDY; YANG, 2011).

Devido às várias vantagens das proteínas vegetais, tem sido estudada a possibilidade da utilização destas para desenvolver hidrogéis, filmes, fibras, nano- e micro-partículas para aplicações médicas, engenharia de tecidos e principalmente a incorporação e liberação de fármacos. No entanto, modificações químicas, tais como a reticulação são muitas vezes necessárias para alcançar as propriedades mecânicas e estabilidade requeridas. Entre as proteínas vegetais, a zeína tem demonstrado o potencial para aplicação em engenharia de tecidos e transporte de fármacos (REDDY; YANG, 2011). Proteínas de soja e trigo também têm sido relatadas como sendo adequadas para engenharia de tecidos, porém, pouco viáveis para o desenvolvimento de NPs (AHMED O. ELZOGHBY, 2012).

As NPs elaboradas com proteínas vegetais representam uma nova abordagem que apresenta algumas vantagens em relação à entrega do fármaco utilizando proteínas animais. Tais proteínas vegetais hidrofóbicas, como zeína e gliadina, têm a capacidade de produzir a liberação sustentada de fármacos (REDDY; YANG, 2011). As proteínas vegetais em comparação às proteínas de origem animal, apresentam menor custo e reduzem o risco de propagação de doenças, como a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca) (AHMED O. ELZOGHBY, 2012).

1.1.1.2 Estabilidade e caracterização das nanopartículas

O estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos, descrito pela resolução RE nº1/05 ANVISA determina a quantificação dos produtos

de degradação, assim como o correspondente método analítico utilizado. A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (SILVA, K. E. *et al.*, 2009).

Os estudos de estabilidade são classificados em acelerado e de longa duração. O estudo acelerado é projetado para aumentar a velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no produto farmacêutico pela utilização de condições drásticas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e estimar o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (ANVISA, 2004). Já o estudo de longa duração é realizado em condições normais de armazenamento com o objetivo de confirmar os dados obtidos no estudo acelerado.

Os testes de estabilidade dos produtos são de suma importância por fornecerem indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais que visam acelerar as alterações a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (ANVISA, 2003). A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (PALUDETTI, 2004).

Independentemente do processo de preparação para obtenção das NPs poliméricas, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas, as quais normalmente não possuem tendência à separação de fases. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, as NPs podem sofrer agregação, resultando na formação de precipitados. Além disso, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, também podem ocorrer. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de NPs (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O processo de caracterização físico-química desses sistemas na maioria das vezes engloba a distribuição de tamanho de partícula, determinação do potencial zeta, pH e da concentração do princípio ativo associado às NPs e o seu teor (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK 2002).

A avaliação do tamanho médio da partícula é um dos parâmetros físico-químicos mais importantes deste sistema coloidal, pois através dele é

possível monitorar a tendência à precipitação e sedimentação das suspensões (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK 2002).

O potencial zeta representa o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Em módulo, um valor relativamente alto de potencial zeta representa uma boa estabilidade da suspensão coloidal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O acompanhamento do valor de pH das formulações indica a estabilidade das suspensões nanoparticuladas. Alterações nos valores em função do tempo podem estar associadas à degradação do polímero, de algum outro componente da formulação ou até mesmo com a difusão do fármaco das nanocápsulas para meio aquoso (GUTERRES, S. S. *et al.*, 1995).

1.1.2 Terpinen-4-ol

Os produtos bioativos extraídos de óleos essenciais (OEs) têm sido cada vez mais investigados devido às propriedades apresentadas por muitos deles, tais como ação antimicrobiana, antioxidante, ação farmacológica e anticâncer. Os terpenoides são uma das principais classes de compostos presentes nos OEs, os quais são encontrados em quase todos os alimentos naturais. Estes têm sido associados com um menor risco de contrair doenças crônicas como as cardíacas e/ou câncer. Entre os OEs, o TTO (Tea tree oil) é o que vem sendo muito estudado, devido as suas propriedades farmacológicas (HYUN-JIN KIM, 2004; KATHERINE A. HAMMER, 2012a; TAGA I, 2012).

O TTO é extraído da planta *Melaleuca alternifolia* (família: Myrtaceae) (Figura 2) nativa da Austrália, sendo cultivada em outros países em menor escala, inclusive no Brasil. O TTO é obtido por hidrodestilação das folhas da *Melaleuca alternifolia*. O óleo essencial desta planta possui uma mistura complexa de cerca de 100 diferentes compostos, principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e os seus álcoois correspondentes, sendo os principais T4OL, γ -terpineno, α -terpineno, α -terpineol, α -terpinoleno e 1,8-cineol (HAMMER *et al.*, 2006; HYUN-JIN KIM, 2004; KATHERINE A. HAMMER, 2012a). Como há uma variedade de compostos nesse óleo, há uma série de padrões que tenta defini-los e limitá-los porque as variações de lote para lote pode ser devida às condições de plantio dessa espécie. Essas variações influenciam na produção da substância ativa pela planta, assim como suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e analgésicas (HYUN-JIN KIM, 2004).

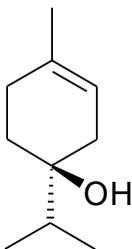
Figura 2 - Folhas da planta *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae).



Atualmente há um padrão internacional regularizador ISO 4730 “óleo de *Melaleuca* tipo T4OL” e farmacopéia Europeia, que estabelece limites máximos e mínimos para 14 compostos do óleo. Os principais componentes são o T4OL e 1,8-cineol. Em relação ao T4OL é exigido um teor mínimo de 30% e para o 1,8-cineol um teor máximo de 15%, sendo que T4OL é o principal responsável pelas propriedades medicinais, principalmente anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, assim como efeitos antivirais e inseticida, enquanto o 1,8-cineol é responsável por causar alergia à pele. Dessa forma, é interessante a presença de maiores quantidades de T4OL e menores quantidades de 1,8-cineol no TTO. Dados publicados mostram que o TTO causa irritação da pele somente em altas concentrações e as reações alérgicas aparecem em indivíduos com pré-disposição e a causa provavelmente é a presença de muitos compostos que sofrem oxidação através da exposição à luz e/ou ar (HYUN-JIN KIM, 2004; TAGA I, 2012).

A Figura 3 apresenta a estrutura química do T4OL. Esse monoterpenoide está presente em vários óleos essenciais de diversas plantas, dentre os quais podem ser citados óleo de *Melaleuca alternifolia*, *Alpinia zerumbet* (SANTOS B.A, 2011), *Camellia sinensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurusnobilis*, *Artemisia*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Cuminum*, *Cupressus*, *Cymbopogon*, *Lantana*, *Lippia*, *Myrsifca*, *Origanum*, *Pimpinella*, *Rosmarinus*, *Salvia* e *Thymus*, entre outras. Devido as suas excelentes características, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas.

Figura 3 - Estrutura química do monoterpeno (-) T4OL.



Por exemplo, Greay *et al.* (2010) estudaram o efeito do TTO e do T4OL contra duas linhagens de células de tumor murino agressivos, mesotelioma AE 17 e melanoma B16. Os resultados indicaram que além de induzir a morte celular, também inibiu o crescimento destas células tumorais agressivas, o que destaca o potencial anticancerígeno e a atividade de TTO e T4OL (GREAY *et al.*, 2010).

Em outro trabalho, também foi realizado o estudo em relação ao câncer de pele, o qual demonstrou a eficácia do TTO e do (+)-T4OL na inibição das células de melanoma humano M14 em teste *in vitro* (CALCABRINI *et al.*, 2004). Outros autores demonstraram elevada citotoxicidade do TTO, que apresenta em sua composição aproximadamente 40% de T4OL, em células cancerígenas do pulmão (A549), mama (MCF-7) e próstata (PC-3) (LIU *et al.*, 2009).

Estudos do efeito antitumoral do T4OL sobre o câncer de pulmão do tipo não pequenas células (representam 80% de todos os casos) indicaram que T4OL induziu o efeito citotóxico. Pela primeira vez foi demonstrado que o T4OL induz apoptose em células de câncer de pulmão em humanos, *in vitro* e *in vivo* (CHIEH-SHAN WU, 2012).

Döll-Boscardin *et al* (2012) investigaram o potencial citotóxico *in vitro* dos óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *Eucalyptus benthamii* e alguns de seus componentes (α -pineno, T4OL e γ -terpineno) em linhas de células Jurkat (leucemia de células T), J774A.1 (tumor de macrófagos murino) e HeLa (câncer cervical). Em relação ao óleo essencial a partir de folhas jovens de *E. benthamii* as células Jurkat revelaram uma resposta mais sensível quando comparadas com as células J77A.1. O óleo essencial obtido a partir de folhas adultas de *E. benthamii* demonstraram o mesmo comportamento para estas duas linhas de células. Dados semelhantes também foram observados para α -pineno, γ -terpineno e T4OL sendo que os terpenos α -pineno e γ -terpineno não mostraram atividade contra J77A.1. No que diz respeito à citotoxicidade contra as células HeLa,

verificou-se que α -pineno, γ -terpineno e T4OL não exibiram efeito nesta células tumorais. Em geral, os óleos essenciais a partir de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* demonstraram algum grau de citotoxicidade contra as linhagens celulares tumorais estudadas, que confirma o seu potencial antitumoral (PATRICIAMATHIAS DOLL-BOSCARDIN; TOMOE NAKASHIMA, 2012).

Recentemente foi estudada a eficiência do T4OL para induzir o crescimento de células de leucemia humana MOLT-4. Os resultados exibiram tanto citotoxicidade como morte celular (PATOMPONG KHAWON, 2012).

Terzi e colaboradores (Terzi, *et al.* 2012) estudaram o efeito de cinco compostos naturais (Timol, eugenol, carvona, T4OL e cineol) como agentes potencialmente fungicidas. Foram testados em 12 diferentes espécies de fungos micotoxigênicos envolvidos em várias doenças em plantas. As atividades antifúngicas de T4OL, eugenol, carvona, 1,8-cineol (eucaliptol) e timol foram analisadas *in vitro* com concentrações das moléculas que variam 0-2%. Os compostos testados mostraram efeitos tóxicos sobre o crescimento *in vitro* de todas as espécies de fungos, mas com diferentes níveis de ação. Entre os cinco componentes naturais testados, três grupos potenciais podem ser identificados: timol, eugenol e carvona foram tóxicas para os fungos nas concentrações mais baixas (metade da concentração máxima eficaz (EC_{50}) = 0,017%). T4OL foi eficaz em concentração intermediária (EC_{50} = 0,047%), enquanto 1,8-cineol foi tóxico apenas com a concentração mais elevada (EC_{50} = 0,248%). Também foi realizado o estudo das propriedades antimicóticas do TTO e seus principais componentes (T4OL, γ -terpineno e 1,8-cineol) *in vitro* sobre quatro fungos patogênicos em cereais. O efeito dos três principais componentes do TTO foi mais ativo que o óleo e, entre os compostos testados o T4OL foi mais eficaz (TERZI *et al.*, 2012).

Garozzo e colaboradores estudaram a atividade antiviral *in vitro* do TTO e os seus componentes principais, T4OL, α -terpineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, terpinoleno e α -terpineol. Os resultados mostraram que o TTO possui atividade antiviral contra vírus da gripe A/PR/8 subtipo H1N1 e que a atividade antiviral tem sido principalmente atribuída ao T4OL, o componente ativo principal do óleo. O TTO se caracteriza como fármaco promissor no tratamento da infecção pelo vírus da gripe (GAROZZO, 2009).

O TTO também é utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos como, por exemplo, ingrediente de perfumaria, ativo ou promotor de penetração. No entanto, relatos sobre a absorção na pele são raros. Desta forma foi investigada a capacidade do T4OL para penetração

na pele humana. Os experimentos de liberação e permeação *in vitro* foram realizados em uma célula de difusão de Franz com membrana e a epiderme humana. Para o estudo de liberação *in vitro* do T4OL foram preparados três tipos de formulações (um creme, uma emulsão e uma pomada) em três diferentes concentrações. A ordem de classificação das taxas de liberação segue a mesma ordem que as concentrações usadas de TTO (10% > 5% > 3%). Em relação à permeação *in vitro*, o T4OL é capaz de permear na epiderme humana com muita facilidade, sendo que a permeação depende da formulação utilizada. Neste estudo a permeação foi mais eficiente para a emulsão, seguido da pomada e por último do creme (REICHLING *et al.*, 2006).

Mondello *et al.* (2006) estudaram *in vitro* e *in vivo* a atividade anti-*Candida* do T4OL e do 1,8-cineol. Estudos demonstraram que T4OL possui uma maior atividade antimicrobiana e, em contrapartida, 1,8-cineol exibiu uma atividade muito mais baixa. No modelo experimental em ratos em relação à infecção vaginal, T4OL foi tão ativo como TTO na aceleração da liberação na vagina de todas as cepas de *Candida* examinadas. Os resultados sugerem que T4OL é um mediador provável *in vitro* e *in vivo* de atividade de TTO. Esta é a primeira demonstração *in vivo* de que o T4OL pode controlar infecções vaginais. O composto puro é uma promessa para o tratamento de candidíase vaginal (MONDELLO, 2006).

Recentemente, foi comprovado que TTO e T4OL exibiram eficácia terapêutica significativa em relação ao modelo comentado anteriormente e que o tratamento oral com TTO tem atividade terapêutica, mesmo contra a candidíase oral (KENTARO NINOMIYA, 2012).

O TTO também tem sido promovido por apresentar propriedades inseticidas e repelentes, o que sugere potencial para uso em tratamentos de feridas ou protetores contra *flystrike* (dermatobiose). Foram realizados estudos laboratoriais para avaliar os efeitos inseticida e repelente do TTO de *Melaleuca alternifolia* contra diferentes estágios da mosca-varejeira *Lucilia cuprinus*. Os resultados mostram que TTO tem forte efeito inseticida e repelente contra a *Lucilia cuprina* e que na maioria dos casos estes efeitos ocorrem em suficientemente baixas concentrações, sugerindo potencial viabilidade para o desenvolvimento comercial no tratamento de *flystrike* e feridas. Também foram preparadas formulações de TTO com outros inseticidas, reduzindo a mortalidade em comparação com os larvicidas utilizados isoladamente. O TTO também tem atividade antimicrobiana e cicatrizante, propriedades que podem ajudar na cicatrização de feridas e proteger contra as infecções secundárias que contribuem para morte por *flystrike*. No entanto, deve-se destacar que os estudos relatados foram conduzidos em laboratório e os ensaios com

animais vivos serão necessários para confirmar os resultados (CALLANDER; JAMES, 2012).

O TTO também é recomendado como um agente antisséptico em lavagens de próteses e enxaguantes bucais e é muito empregado devido às propriedades antimicrobianas, sendo incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas para o tratamento de infecções cutâneas. É amplamente disponível para venda na Austrália, Europa e América do Norte e é comercializado como um remédio para várias doenças, a fim de se evitar a utilização de antibióticos. É topicamente aplicado, como por exemplo, em infecções bacterianas, fúngicas, virais e inflamatórias (CARSON, 2006; KATHERINE A. HAMMER, 2012b; THOMSEN, 2013).

A avaliação quantitativa da penetração percutânea de terpenos é uma questão importante para a previsão de sua atividade (por exemplo, como promotores de penetração) ou para a compreensão do mecanismo de sua ação na pele. A absorção e retenção de dois terpenos, (\pm)-linalol e T4OL, no estrato córneo foi determinada, com aplicação *in vivo* usando-se dois veículos tópicos: solução oleosa (óleo de semente de uva) e carbopol hidrogel, que continham 5% (m/m) dos terpenos. O veículo hidrogel garante melhor absorção de terpenos no estrato córneo que em solução oleosa (CAL K, 2006).

Recentemente foram desenvolvidos nanocarreadores para liberação e proteção do T4OL. As NPs de lipídeos estabilizadas com polietilenoglicol (PEG) foram preparadas e caracterizadas. Os resultados mostraram tamanho homogêneo das NPs, alta carga, estabilidade e liberação controlada. As NPs carregadas com T4OL foram testadas contra *Candida albicans* ATCC 11231, sendo que esta é muito resistente ao tratamento com antibióticos por ser capaz de formar biofilmes, que são estruturas complexas que tornam a infecção difícil de tratar. As NPs foram capazes de romper esta estrutura (LI, 2012).

1.1.3 Zeína

1.1.3.1 Histórico

O milho é utilizado principalmente para alimentação, mas uma quantidade crescente vem sendo utilizada para biocombustível e aplicações na área da ciência de materiais. A produção mundial de milho é de cerca de 560 milhões de toneladas anualmente, sendo que os Estados Unidos produzem sozinhos cerca da metade desta quantidade. O milho é

processado essencialmente por três métodos: moagem a seco, processamento alcalino e moagem úmida (GÓMEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2012; SHUKLA; CHERYAN, 2001). Este processo envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas com o objetivo de separar o grão de milho em frações relativamente puras: germe (com alto teor de óleo), fibra (proveniente do pericarpo dos grãos), amido (61%) e glúten (7%) de alto teor proteico (> 60%), o qual é constituído pelas proteínas glutelina, globulina, albumina e prolamina. O conteúdo de proteínas em diferentes tipos de milho varia entre 6 a 12% da massa seca dos grãos, sendo que aproximadamente 80% das proteínas estão contidas no endosperma. Dentre as prolaminas, a principal é a zeína que representa cerca de 50%, tornando-se a principal proteína contida no endosperma do grão (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

1.1.3.2 Composição e estrutura

As proteínas do milho podem ser divididas, de acordo com sua solubilidade, em quatro frações e são constituídas de aproximadamente 20% de globulinas (solúveis em solução salina) e albuminas (solúveis em água), 40% prolaminas (insolúveis em água e solúveis em álcool 70%) e 40% de glutelinas (insolúveis em água e álcool). As proteínas desses dois últimos grupos são também conhecidas como proteínas de reserva. As prolaminas são comuns em todos os cereais e são ricas em prolina e glutamina (NELSON, 1969; SHUKLA; CHERYAN, 2001). A família da zeína consiste de uma mistura de polipeptídeos que podem ser identificados, por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDSPAGE), em 6 frações que podem ser divididas em classes: δ -zeína (10 kDa), β -zeína (16 kDa e 14 kDa), α -zeína (19 kDa e 22 kDa) e γ -zeína (27 kDa). A α -zeína representa a classe mais abundante, perfazendo 60-70% do total, seguido γ -zeína (10-20%), β -zeína (10%) e δ -zeína (1-5%) (MOMANY, 2006; PRASANNA, 2001; SHUKLA; CHERYAN, 2001). Todas as frações de zeína são consideradas anfífilas porque contêm ambos resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos (NONTHANUM, 2012).

Em relação à composição de aminoácidos da zeína, as análises mostram predominância de grupos residuais fortemente apolares, como leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%) e baixo conteúdo de resíduos de lisina e triptofano (PRASANNA, 2001; SHUKLA; CHERYAN, 2001). A presença desses aminoácidos confere à zeína maior caráter hidrofóbico que, por exemplo, permite a preparação de NPs para encapsulação de diversos compostos hidrofóbicos (ZHONG; JIN, 2009). Além das

excelentes propriedades para desenvolvimento de NPs, também é muito utilizada para preparação de filmes comestíveis para cobertura de alimentos (CHO; LEE; RHEE, 2010) e medicamentos (XU, 2011), protegendo-os da umidade e de processos de oxidação.

1.1.3.3 Características

A zeína é uma proteína com massa molecular variando de 19–22 kDa (KIM, S.; XU, 2008; PRASANNA, 2001). As zeínas são consideradas seguras (GRAS) e como ingrediente alimentar pelo FDA, contendo 75% de resíduos de aminoácidos lipofílicos e 25% de aminoácidos hidrofílicos (PRASANNA, 2001). A solubilidade da zeína é devido à presença de grupos hidrocarbonetos nas cadeias laterais, a zeína é insolúvel em água, acetona e álcoois anidros (exceto metanol), porém solúvel em álcoois, éter etílico, solução alcalina (pH 11 ou superior) e glicóis, entre outros. A alta reatividade química da zeína é determinada pela presença de seus grupos funcionais (amina, amida, carboxila e hidroxila) (SHUKLA; CHERYAN, 2001; SIGMA, 2003).

1.1.3.4 Algumas aplicações da zeína

A zeína tem sido extensivamente investigada pela sua capacidade de formar NPs por auto-associação para encapsulação de compostos bioativos em alimentos tais como óleo de peixe (ZHONG; TIAN; ZIVANOVIC, 2009) e OEs (PARRIS 2005), entre outros (LUO *et al.*, 2011b; ZHONG; JIN, 2009). Também têm sido desenvolvidas partículas nanométricas que podem ser usadas para liberação controlada de fármacos com aplicação biomédica (PATEL, 2010; LAI, 2011; LUO *et al.*, 2010; REDDY; YANG, 2011). O desenvolvimento de NPs de zeína tem demonstrado um bom potencial de liberação tanto *in vitro* como *in vivo*.

NPs de proteínas também vêm sendo estudadas como veículo de entrega de nutrientes, como riboflavina em sistema digestivo artificial, sendo que este tipo de aplicação é muito limitado até o momento. Foram desenvolvidas, por CHEN *et al.* (2010), microesferas de proteína isolada de soja (SPI), zeína e complexo SPI-zeína como veículos de entrega de riboflavina em condições de jejum e prandial em um sistema digestivo artificial. O estudo demonstrou que microesferas de SPI e zeína no compartimento do estômago ocorreu em 15 min. Já as microesferas do complexo SPI-zeína forneceram liberação controlada de riboflavina, dentro de 4 horas após a administração oral e perfis de absorção de nutrientes

próximas de zero, tanto no estado de jejum como no prandial. A incorporação dessas microesferas pode retardar a liberação de riboflavina após administração por via oral, que pode ser desejável, por que isso iria aumentar a probabilidade de atingir o intestino para a absorção em estado intacto e ativo (LINGYUN CHEN, 2010).

As NPs de zeína foram preparadas para encapsulação da vitamina D3 (VD3) e/ou revestidas com carboximetilquitosana (CMCS) na ausência e presença de cálcio como reticulante, sendo utilizado para reticular CMCS para obter um revestimento denso e mais espesso. O tamanho variou de 86-200 nm e a EE (eficiência de encapsulação) aumentou de 52,2% para 87,9% quando revestidas com CMCS e na presença de cálcio, apresentaram estrutura esférica. As interações do tipo ligação de hidrogênio, eletrostática e hidrofóbica foram consideradas como sendo as principais forças para a formação de complexos de NPs. As NPs revestidas proporcionaram melhor liberação controlada da VD3 tanto em meio de tampão fosfato salino (PBS) quanto no trato gastrointestinal similar. A fotoestabilidade foi significativamente maior após o encapsulamento. A encapsulação de nutrientes hidrofóbicos em NPs de zeína com revestimentos de CMC representa uma abordagem promissora para aumentar a estabilidade química e propriedades de liberação controlada (LUO, 2012).

As NPs de luteína/zeína foram preparadas com sucesso pela técnica de dispersão da solução melhorada por fluídos supercríticos. Os resultados mostraram elevada carga e alta EE, sendo que os parâmetros estudados (temperatura, pressão, proporção luteína/zeína e taxa de fluxo) influenciaram significativamente na morfologia, carga, tamanho e EE. O perfil de liberação, próximo de ordem zero, sugere que as NPs desempenham um papel controlado na liberação de luteína (HU, D. *et al.*, 2012).

Luo e colaboradores desenvolveram com sucesso um sistema quitosana (CS)/zeína para encapsular os compostos selenito e α -tocoferol, tendo sido verificado que as propriedades antioxidante e as propriedades de liberação dos compostos encapsulados foram significativamente melhoradas (LUO *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2011a).

A zeína foi investigada para utilização como um sistema de distribuição de fármaco por via oral. As micropartículas de zeína carregadas com prednisolona foram obtidas pelo método de coacervação. Para investigar a adaptabilidade deste método para outros fármacos, as micropartículas de zeína foram carregadas com hidrocortisona, que apresenta estrutura semelhante à da prednisolona, ou mesalazina, que é estruturalmente diferente. Foi obtida com êxito a encapsulação dos fármacos investigados, sendo que os resultados foram excelentes quando a

hidrocortisona foi encapsulada, já que se apresentou resistente ao processo digestivo do estômago e do intestino delgado, levando o sistema a oferecer vantagens sobre os comprimidos disponíveis comercialmente. No entanto, as grandes doses de mesalazina usadas clinicamente fazem com que a quantidade de micropartículas necessárias para uma dose de mesalazina não seja prática. Estes resultados sugerem que existe um potencial para formular um sistema de entrega baseado em micropartículas de zeína (LAU *et al.*, 2013).

As NPs com estrutura compacta e esférica, e com distribuição de tamanho estreito foram preparadas pelo processo de atomização eletrohidrodinâmica (eletrospray) a partir da proteína zeína, com concentração variando de 2,5 a 15%. Foram obtidos tamanhos de 175 - 900 nm, com aumento da concentração do polímero. A morfologia das NPs não se alterou após a incorporação de curcumina e o EE foi de 85-90%. As NPs de zeína se apresentaram estáveis durante três meses de armazenamento a 23 °C e 43% umidade relativa. Com o encapsulamento, a curcumina apresentou boa dispersão em uma matriz aquosa de alimentos, o leite semi-desnatado, tornando possível estender o uso de curcumina como um corante em produtos alimentares aquosos (GOMEZ-ESTACA *et al.*, 2012).

Recentemente, foi realizada a preparação de partículas coloidais de zeína:quercetina pelo método de precipitação de cosolvente (coprecipitação), utilizando caseinato de sódio como um estabilizador eletroestérico. As partículas esféricas obtidas foram caracterizadas de acordo com o tamanho, carga de superfície e morfologia. O tamanho das partículas e carga de superfície de zeína:quercetina variaram de 130-161 nm e de -30 a -41 mV, respectivamente. A caracterização do estado sólido (difração de raios X e DLS) e medições espectrofotométricas (espectrofotometria de UV e FTIR) confirmaram as alterações das características da quercetina devido ao aprisionamento das partículas coloidais na matriz do biopolímero. Os resultados do estudo do caráter antioxidante demonstraram que o aprisionamento das partículas coloidais de quercetina levou a uma maior estabilidade química durante o pH alcalino e à fotodegradação sob irradiação UV. O fato de que os componentes utilizados para a preparação de partículas coloidal são comestíveis, sugere que a formulação desenvolvida possa ser promissora para a área de liberação de compostos bioativos em produtos alimentares (PATEL *et al.*, 2012).

Os OEs têm sido extensivamente estudados por demonstrarem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, no entanto, a solubilidade em água limita sua aplicação. Dessa forma, estudos para melhorar a solubilidade dos OEs vêm sendo realizados via nanotecnologia.

Recentemente foi realizado estudo com os OEs timol e carvacrol: os fenóis foram encapsulados em NPs de zeína utilizando o método de dispersão líquido-líquido, com a finalidade de melhorar a solubilidade, mantendo suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. A morfologia, estrutura e propriedades da atividade antioxidante e antimicrobiana das NPs foram estudadas demonstrando que a encapsulação de OEs em NPs de zeína pode melhorar a sua solubilidade em até 14 vezes sem prejudicar sua capacidade de desativar os radicais livres. Dessa forma, a utilização da nanoencapsulação aumenta o potencial para aplicação de OEs para conservação de alimentos e no controle de bactérias patogênicas humanas (WU; LUO; WANG, 2012).

Foram desenvolvidas micropartículas biodegradáveis para administração de antibiótico com a finalidade de manter níveis eficazes de tetraciclina em bolsa periodontal para o tratamento de infecções localizadas a partir de dois polímeros biocompatíveis poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e zeína, os quais foram compactados em dispositivo monolítico. Nesse estudo, verificou-se ser eficaz a liberação controlada de tetraciclina, e, portanto, pode ser adequada para entrega de agentes antimicrobianos no tratamento periodontal (DE SOUSA, 2012).

Zou *et al.* (2012) realizaram a preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade das NPs de zeína carregadas com procianidinas (CPs) extraídas de oxococos (cranberries). As CPs tem efeito preventivo sobre as infecções urinárias. As NPs foram preparadas em quatro proporções em massa de CPs-zeína (1:8; 1:6; 1:4 e 1:2), nas quais apresentaram aumento no tamanho de partícula de 392 nm a 447 nm com o aumento das razões de massa CPs-zeína. Já o ζ (mV) e EE (%) foram acompanhados por uma diminuição de 20,9 mV e 77% (proporção em massa 1:8) para 14,2 mV e 55,5% (proporção em massa 1:2), respectivamente. Com o aumento no teor da proteína na solução ocorreu maior encapsulação de CPs, o que pode explicar o aumento no tamanho das partículas. Morfologicamente, as NPs de CPs-zeína são esféricas. Entre outras propriedades, NPs de CPs-zeína diminuem a citotoxicidade das células de leucemia promielocítica de humanos (HL-60) em comparação com a solução de CPs (ZOU *et al.*, 2012).

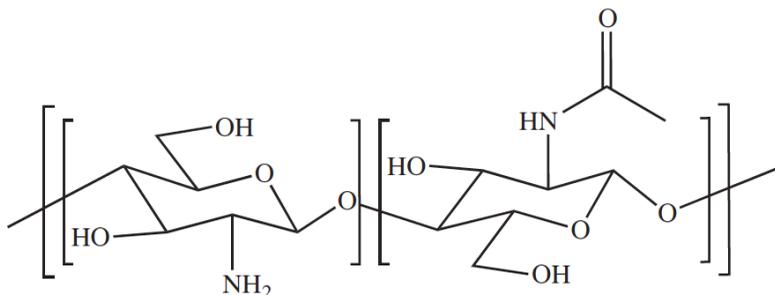
Estudo demonstrou que a zeína pode aumentar a proliferação celular. Além disso, foi demonstrado que zeína interage com as membranas das células e pode ser utilizada como veículo para fármacos peptídicos através das membranas celulares. As excelentes propriedades da zeína tornaram-na adequada para o desenvolvimento de sistemas de entrega de genes. Desta forma, nanoesferas de zeína encapsulando DNA foram formadas pelo método de coacervação simples, sem o uso de solventes

fortes ou temperaturas, resultando na preservação da integridade do DNA e obtendo tamanhos adequados. As esferas foram capazes de proteger o DNA encapsulado contra a degradação, e a natureza hidrofóbica da zeína resultou em esferas capazes de realizar a liberação sustentada do DNA, apresentando-se biocompatível com as células. A zeína parece ser uma excelente ferramenta para a entrega de DNA com a capacidade de obter aplicações específicas, incluindo a entrega de genes pela via oral e injeção intramuscular (REGIER, 2012).

1.1.4 Quitosana

A quitosana (CS) (Figura 4) é um polissacarídeo biodegradável de caráter catiônico devido à presença de grupos aminos em sua estrutura. É um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-*N*-acetil-*D*-glucosamina e 2-desoxi-*D*-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -1-4, sendo obtida pela desacetilação da quitina, um polímero encontrado abundantemente na natureza, sendo extraído principalmente do exoesqueleto de crustáceos, insetos e de alguns fungos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; SINHA *et al.*, 2004).

Figura 4- Estrutura molecular da CS.



A CS é disponível em diferentes faixas de massa molecular (50 kDa - 2000 kDa) e grau de desacetilação (40% - 98%), os quais variam de acordo com os tipos e condições de polimerização e desacetilação. A massa molecular e o grau de desacetilação são os principais fatores que afetam o tamanho das partículas, a formação de partículas e agregação (RAY, 2011; TIYABOONCHAI, 2003). A CS é uma base fraca com valores de pKa entre 6,2 e 7,0, tornando-se solúvel em soluções de ácidos fracos (pH < 6,5), devido à protonação dos grupos NH₂. O ácido acético é o solvente

mais empregado para sua solubilização. Torna-se insolúvel em pH neutro ou alcalino, pois os grupos aminos de sua molécula são desprotonados e o polímero perde suas cargas (GEORGE; ABRAHAM, 2006; KRAJEWSKA, 2004; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; OKUYAMA *et al.*, 2000; QIN *et al.*, 2006; SINHA *et al.*, 2004).

A CS, por apresentar uma série de propriedades, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxidez, hidrofiliçidade e atividade antifúngica e antibacteriana, têm mostrado potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis e esferas. Além disso, pode ser obtida a partir de diversas fontes naturais a um baixo custo (PIRES, 2009; DASH *et al.*, 2011; HEJAZI; AMIJI, 2003; KONG *et al.*, 2010; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Nos últimos 20 anos, tem havido considerável interesse na área farmacêutica para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos mais eficazes baseados em CS. Além de inúmeras aplicações, a CS mostrou características promissoras como agente auxiliar na entrega de fármacos, sendo possível devido ao caráter catiônico baseado nos grupos aminos primários, que são responsáveis por várias propriedades como mucoadesão, gelificação *in situ*, transfecção de genes, aumento da permeação e liberação controlada de fármacos (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2012).

Desde a descoberta de polissacarídeos na superfície de células e a alta afinidade da CS por membranas celulares, vários pesquisadores têm utilizado a CS e seus derivados como materiais de revestimento para sistemas nanoestruturados (CALVO, 2001).

A CS e seus derivados têm sido utilizados com sucesso como agentes de revestimento para aplicação médica, principalmente no combate ao câncer, tendo capacidade para aumentar o tempo de circulação no sangue e atingir os tecidos tumorais específico. Esses revestimentos também permitem melhorar a absorção do fármaco através de vias nasal ou ocular, devido à mucoadesão e/ou as propriedades permeabilidade dos polissacarídeos (LEMARCHAND, 2004).

1.1.5 Câncer

1.1.5.1 Aspectos Gerais

O câncer pode ser definido como uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada de formas anormais das células corporais, abrangendo um conjunto de mais de cem tipos da doença. O

câncer é uma patologia de etiologia multifatorial, que afeta todos os grupos etários, resultando principalmente de alterações genéticas, fatores ambientais e do estilo de vida (FEARON, 1990; POPIM, 2008). Representa um sério problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Uma característica marcante do câncer é o fato de que em um estágio avançado da doença as células cancerosas são capazes de invadir determinados tecidos e órgãos, gerando ali outros tumores malignos, em um processo conhecido como metástase (DAZARD, 2000). Dividindo-se rapidamente, tais células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis (POPIM, 2008). Assim, os diversos tipos de câncer diferenciam-se entre si pela velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos (desenvolvimento das chamadas metástases).

Atualmente o câncer é uma das maiores ameaças para a saúde pública mundial. De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais. No meio ambiente são encontrados um grande número de fatores de risco. As mudanças provocadas no meio ambiente pelo ser humano, os hábitos e o estilo de vida adotada pelas pessoas podem determinar diferentes tipos de câncer, como por exemplo: o cigarro predispõe ao câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Os fatores de risco ambientais para o câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos, e atuam alterando a estrutura genética das células. O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer (BRASIL, 2013).

Outros fatores estão em estudo, tais como alguns componentes dos alimentos que são ingeridos, porém, muitos são ainda completamente desconhecidos. Também outro fator importante é o envelhecimento, que traz mudanças às células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Esta característica, somada ao fato de que as células das pessoas idosas foram expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco de câncer, explica em parte o porquê deste ser mais frequente nestes indivíduos. Os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos são raros, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese (BRASIL, 2013).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam a ocorrência de aproximadamente 580 mil novos casos de câncer. A previsão é que o tumor de pele do tipo não melanoma, o mais frequente na população feminina e masculina, atinja 182 mil novos casos. Depois deste, o que mais acomete homens é o câncer de próstata (69 mil) e as mulheres o câncer de mama (57

mil). Em seguida, para ambos os sexos ocorrem o câncer de cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil), reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Ao todo são 19 os tipos de câncer mais incidentes, sendo 14 na população masculina e 17 na feminina (BRASIL, 2013).

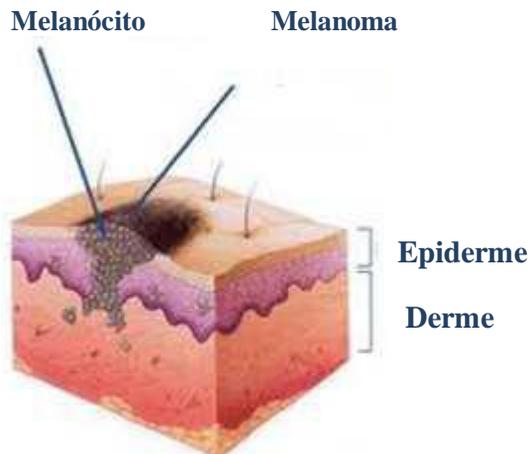
A Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, e 17 milhões de mortes pela doença. Os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil (BRASIL, 2011).

1.1.5.2 Câncer de pele

O câncer de pele se apresenta sob a forma de duas variantes: melanoma e não melanoma (DAZARD, 2000). O tipo mais frequente de câncer de pele na população brasileira é o não melanoma. O não melanoma apresenta-se sob a forma de carcinoma basocelular e carcinoma epidermoide com 70% e 25 % dos casos, respectivamente. Porém, como os casos de não melanoma são diagnosticados precocemente, o índice de cura é elevado (FIGUEIREDO, 2003; ROCHA, 2002).

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que confere pigmentação à pele) (Figura 5), sendo a principal causa de morte por doenças de pele, caracterizando-se pela alta capacidade de infiltração no SNC, com predominância em adultos brancos. Os melanomas também podem surgir nos olhos (úvea, conjuntiva e no corpo ciliar), meninges e em várias superfícies mucosas (GARBE, 2012).

Figura 5 - Lesão dos melanócitos nos tecidos cutâneos.



Fonte: (SAMPAIO, 2001).

Apesar de representar uma baixa porcentagem dos cânceres de pele (4%), o melanoma é de extrema gravidade, pois apresenta alta probabilidade de ocorrência de metástase (ROCHA, 2002). O prognóstico de pacientes com melanoma metastático é desfavorável e, apesar dos grandes avanços no seu tratamento, ele ainda é responsável por um número considerável de óbitos (SOUZA, 2004), representando 90% das mortes associadas a tumores cutâneos (GARBE, 2012). Embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele, relatos de várias partes do mundo demonstram um crescente aumento na sua taxa de incidência (4 a 8%) (RICOTTI, 2009).

Dentre os fatores de risco que contribuem para a gênese das lesões de pele, os fatores genéticos e exposição à radiação UV já estão bem definidos (CASTILHO, 2010). Os raios UV, além de facilitarem mutações genéticas, exercem efeito supressor no sistema imune cutâneo (GALLAGHER, 2006). Em países tropicais, as pessoas com exposição prolongada crônica como marinheiros e agricultores constituem o grupo de maior risco e, neste caso, a possibilidade de desenvolverem câncer de pele aumenta de forma acentuada com o avanço da idade (FRIEDMAN, 1999).

A radiação UV penetra na pele e, de acordo com o comprimento de onda, interage com as diferentes células localizadas nas diferentes camadas (MONTAGNER, 2009). De acordo com o comprimento de onda, o espectro

da UV é subdividido em três bandas: UVA, UVB e UVC. Os raios UVA apresentam o comprimento de onda mais longo (315-400 nm), penetram de modo mais profundo na pele e atingem queratinócitos da epiderme e fibroblasto da derme (KRUTMANN, 2001), sendo indutores de processos oxidativos. A banda UVB (280-315 nm) é mais absorvida na epiderme e afeta predominantemente os queratinócitos, sendo responsável por danos diretos ao DNA, foto imunossupressão, eritema, espessamento do estrato córneo e melanogênese. Os raios UVC (100-280 nm) são carcinogênicos e contêm o pico de absorção pelo DNA puro.

Cada tipo de onda atua de modo específico. A radiação UVA age indiretamente através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam na ativação de fatores envolvidos na transcrição do DNA. Esse processo resulta em mutações no DNA mitocondrial (HERNANDEZ-PIGEON, 2007; KRUTMANN, 2001). A radiação UVB, por sua vez, também gera ROS, porém sua principal ação é a indução direta de dano ao DNA (STEGE, 2000). Os raios UVC são absorvidos pelo DNA e provocam sua mutação. Essa interação cria fotoprodutos diméricos como pirimidinas, que podem estar relacionadas a lesões cutâneas pré-malignas, porém sem elucidação de relevância com outras manifestações do fotoenvelhecimento (SVOBODOVA, 2012).

Devido à destruição da camada de ozônio, a incidência de raios UVB, intrinsecamente relacionados ao câncer de pele, vem aumentando progressivamente, permitindo, inclusive, que raios UVC se aproximem mais da atmosfera terrestre. Já a incidência dos raios UVA independe da camada de ozônio e, portanto, causa câncer de pele em indivíduos que se expõem ao sol, sobretudo em horários de alta incidência, continuamente e durante muitos anos (POPIM, 2008).

Embora seja perfeitamente prevenível, o melanoma está atingindo proporções alarmantes. A taxa de incidência vem aumentando mais rapidamente que qualquer outro tumor. Segundo o INCA, o câncer de pele será responsável por 31,5% dos tumores previstos no país para 2014, além de causar um envelhecimento precoce e lesões nos olhos (BRASIL, 2013). O câncer de pele pode aparecer de repente ou pode desenvolver-se a partir ou em torno de pintas. Apresenta-se como uma mancha de contornos irregulares, em diferentes tons de castanho e negro.

Segundo os dados do INCA, o câncer de pele do tipo não melanoma é o mais incidente em homens na maioria das regiões do Brasil, com um risco estimado de 85/100.000 na Região Sul, 55/100.000 na Região Nordeste, 53/100.000 na Região Sudeste e 25/100.000 na Região Norte; enquanto que na Região Centro-Oeste (44/100.000). Nas mulheres é o mais frequente nas regiões Sul (87/100.000), Centro-Oeste (66/100.000),

Nordeste (61/100.000) e Norte (28/100.000); enquanto que na Região Sudeste (56/100.000). Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada; porém sua incidência é baixa (2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres a cada ano). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sul (BRASIL, 2013).

Mesmo com todos os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos neste tipo de câncer, o tratamento do melanoma é ainda insignificante, representando um dos tumores sólidos mais difíceis de tratar atualmente (JACK, 2006). Para o tratamento deste tipo de enfermidade podem ser utilizadas a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, dependendo do tipo e do estágio da doença (RICOTTI, 2009; SOENGAS, 2003). Apesar dos agentes quimioterápicos teoricamente alcançarem os sítios metastáticos, atualmente os tratamentos disponíveis não promovem benefícios terapêuticos significativos. Assim, levando em consideração a elevada resistência dos melanomas metastáticos aos agentes quimioterápicos, é fundamental a investigação de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas (SOENGAS, 2003).

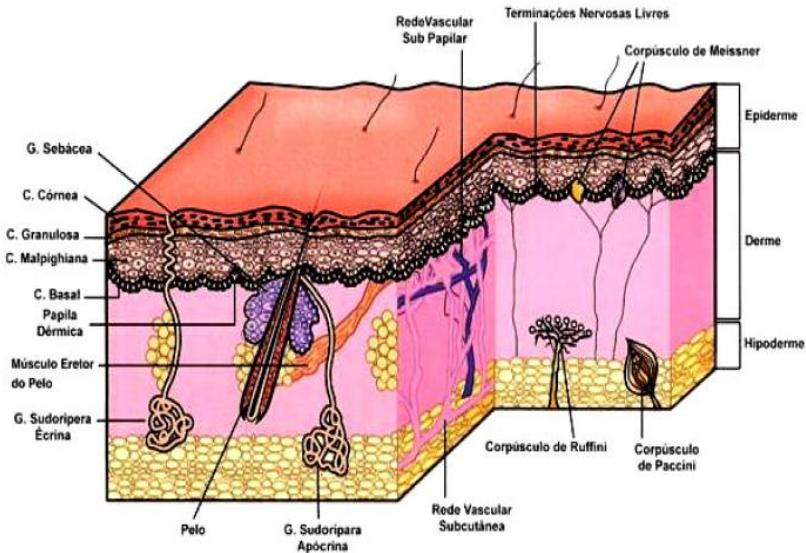
1.1.6 Pele

1.1.6.1 Anatomia, histologia e fisiologia

A pele é o maior órgão do corpo humano, recobrendo uma área de aproximadamente 2 m² que faz contato entre nosso corpo e o ambiente externo, agindo como um envoltório de proteção ao meio externo e como um controlador da perda de fluidos corporais, evitando assim a entrada de substâncias estranhas e nocivas ao organismo. Desempenha muitas funções importantes no organismo humano, tais como a proteção física, química, microbiológicas e UV, manutenção da temperatura corporal, funções sensoriais (sensações de calor, frio, pressão, dor e tato) e imunológicas. Trata-se de um órgão muito complexo, possuindo grande variedade de células (CÔRREA, 2005; FOLDVARI, 2000; HADGRAFT, 2001; MONTEIRO-RIVIERE, 2006; PUZZI, 2006).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 6), sendo que cada camada é definida pela posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. A primeira camada, sendo a mais externa, é composta pela epiderme; a camada intermediária pela derme; e a camada profunda, a hipoderme (GUTERRES, SÍLVIA S.; ALVES; POHLMANN, 2007; MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

Figura 6 - Estrutura da pele.



Fonte: (SAMPAIO, 2001).

A epiderme é a camada mais externa da pele e sua espessura varia de 100 e 150 μm . A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pelos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. É constituída por quatro camadas, sendo que a camada mais superficial é o estrato córneo ou camada córnea. Mais abaixo se encontram as camadas granular, espinhosa e basal (FOLDVARI, 2000; GAIKWAD, 2013).

A camada basal, também chamada de camada germinativa, a mais profunda e que realiza contato com a derme, é formada por células jovens, colunares, em multiplicação constante e são responsáveis por renovar as células da epiderme. A camada basal apresenta células que estão em constante divisão, que migram para cima para formar sucessivamente o camadas espinhosa, granular e basal. Como parte deste processo, as células gradualmente perdem seus núcleos e submetem-se a alterações na composição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. As células tornam-se queratinizadas à medida que migram para a superfície (FOLDVARI, 2000; GAIKWAD, 2013; SAMPAIO, 2001).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, sendo a principal barreira física à entrada de substâncias na pele e à perda de água. É formado por dois sistemas heterogêneos, compostos por queratinócitos

(também conhecidos como corneócitos), embebidos em uma matriz lipídica intercelular, organizada em bicamadas lamelares nas quais se alternam domínios hidrofílicos e lipofílicos, que podem servir de caminho para o transporte de fármacos (BARRY, B. W., 2002; GAIKWAD, 2013; GUTERRES, SÍLVIA S. *et al.*, 2007; HADGRAFT, 2001).

A derme é um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente às agressões e fornece nutrientes à epiderme. É constituída por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina e outros elementos da matriz extracelular, como proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água (FOLDVARI, 2000; GAIKWAD, 2013; SAMPAIO, 2001).

Já a hipoderme é denominada como um tecido adiposo que protege o corpo contra traumas físicos, além de servir como reserva energética e barreira térmica. Os folículos pilosos e ductos sudoríferos encontrados nesta camada se comunicam com o meio externo através da superfície da pele, constituindo uma rota de passagem de substâncias (EL MAGHRABY; BARRY, 2008; GAIKWAD, 2013; SAMPAIO, 2001).

1.1.6.2 *A pele como via de administração*

A pele representa uma via importante e atrativa para administração de substâncias, devido aos problemas associados com outras rotas de administração, como a via oral e parenteral. É considerada como uma rota não invasiva e capaz de evitar a degradação de vários fármacos.

A utilização da pele como via de administração de fármacos é uma opção interessante, pois além de seu efeito cutâneo (tratamento local) possibilita a obtenção de um efeito sistêmico (terapias transdérmicas) (PRAUSNITZ, 2004). A administração transdérmica de drogas proporciona muitas vantagens sobre outras vias tradicionais de administração (EL MAGHRABY *et al.*, 2008; HADGRAFT, 2001). A rota de administração transdérmica não só fornecem níveis plasmáticos constantes, resultado da liberação contínua de fármaco por determinado período, mas também tem outras vantagens como a menor incidência de efeitos colaterais, devido à ausência de picos de concentração, o fato de não ser invasiva, e a possibilidade da medicação poder ser terminada por remoção rápida da sua aplicação na superfície da pele.

Ao mesmo tempo, a administração transdérmica de fármacos tem algumas desvantagens, sendo que a principal delas é a natureza de barreira da pele, que apresenta um obstáculo significativo para a maioria dos medicamentos a serem permeados, sendo que somente fármacos

relativamente potentes(alta solubilidade, permeação) são adequados para a administração transdérmica. Isso leva alguns pacientes a desenvolver dermatite de contato no local de aplicação, a partir de um ou mais dos componentes do sistema, necessitando a interrupção (GAIKWAD, 2013; HADGRAFT, 2001).

O percurso através do qual ocorre a permeação é largamente dependente de características físico-químicas do fármaco, sendo importantíssimo a capacidade de distribuição em cada fase da pele. A permeação transdérmica pode ser visualizada como uma série de combinações em sequência como: (a) adsorção de uma molécula penetrante na superfície da camada do estrato córneo, (b) difusão através do estrato córneo e da epiderme e, finalmente, (c) através da derme. A camada de tecido viável e os capilares são relativamente permeáveis e a circulação periférica é suficientemente rápida, assim a difusão através do estrato córneo é o passo limitante (GAIKWAD, 2013).

As moléculas podem penetrar no estrato córneo através de três rotas: via transcelular, intercelular e pelos apêndices. Em condições normais, a penetração através dos apêndices não é muito significativa, devido a baixa predominância dos mesmos na pele (EL MAGHRABY *et al.*, 2008). O número de folículos, o diâmetro de abertura e o volume folicular são fatores que interferem na liberação de fármacos nesses apêndices (HADGRAFT, 2001; OTBERG *et al.*, 2004).

Na via transcelular, as moléculas atravessam as membranas das células e encontram um meio hidrofílico no interior das mesmas. Na rota intercelular, as moléculas interagem com a matriz lipídica intercelular, sem penetrar pelas células (BARRY, B., 2002; HADGRAFT, 2001).

O estrato córneo apresenta características físico-químicas diferenciadas, permitindo a passagem tanto de moléculas hidrofílicas (em menor grau) quanto lipofílicas, mas apenas moléculas de baixa massa molecular. O fármaco deverá ter afinidade para ambas as fases lipofílicas e hidrofílicas. As características extremas de particionamento não são propícias para a entrega bem sucedida do fármaco através da pele. O fármaco deverá ter um ponto de fusão baixo. Uma vez que a pele tem pH de 4,2 a 5,6, as soluções que têm esta faixa de pH são usadas para evitar danos na pele. Entretanto, para alguns fármacos, pode haver também absorção transdérmica em valores de pH em que a forma não ionizada do fármaco é predominante (BARRY, B., 2002; GAIKWAD, 2013; HADGRAFT, 2001).

Os avanços na tecnologia transdérmica para liberação de fármacos têm sido rápidos devido a sofisticação da ciência de polímeros, que agora permite a incorporação de polímeros em sistemas transdérmicos em

quantidade adequada. A taxa de liberação a partir destes sistemas pode ser adaptada pela variação da composição polimérica. A seleção de membranas poliméricas é muito importante para planejar uma membrana adequada para ocorrer uma permeação controlada (GAIKWAD, 2013).

A falta de permeabilidade é um problema considerável na permeação (entrega) de medicamentos para e através da pele. Uma busca para promover a permeação através da pele, devido a pouca penetração do fármaco envolve a incorporação de compostos químicos para intensificar o sistema de entrega transdérmica de fármacos, como etanol, propilenoglicol, terpenos (eugenol, limoneno) e ácidos graxos (ácido oleico), entre outros. Outra forma para diminuir esta falta de permeabilidade são os mecanismos físicos, tais como iontoforese e fonoforese, que podem ser utilizados para determinados tipos de fármacos (GAIKWAD, 2013).

Estudos vêm demonstrando que *d*-limoneno pode melhorar a permeação de ambos os fármacos hidrofílico (como propranolol, succinato de sumatriptano) e lipofílico (como a testosterona, cetoprofeno, indometacina e estradiol) (AMNUAIKIT *et al.*, 2005; BARRY, 2012). A proposta para melhorar a permeação do fármaco na pele é, principalmente, aumentar a difusividade do fármaco na pele, modificando a camada intercelular e perturbando a estrutura altamente ordenada de lipídios.

O composto bufalin é bem conhecido pela sua cardiotoxicidade, com possibilidade de causar efeito colateral grave. É um composto de pequena massa molar ($386,5 \text{ g mol}^{-1}$), com uma lipofilicidade adequada ($\log P = 2,78$). No entanto, a solubilidade em água é baixa ($33 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), o que limita a força de permeação através da derme. Devido à taxa de penetração baixa, foi necessário utilizar melhoradores químicos para a administração transdérmica. Os terpenos, especialmente *d*-limoneno, foram os mais eficazes entre os promotores químicos utilizados, aumentando significativamente a taxa de permeação de bufalin em até 22 vezes. O ácido oleico também foi utilizado, porém não foi tão eficiente como os terpenos utilizados, *d*-limoneno, 1,8-cineol e *L*-mentol (YANG *et al.*, 2013).

Krishnaiah e colaboradores estudaram a permeabilidade do cloridrato de nicardipina na pele e para melhorar a velocidade de permeação foi utilizado *d*-limoneno como promotor de permeação. Quando se adicionou *d*-limoneno à formulação a permeação foi de cerca 8 vezes maior (KRISHNAIAH; SATYANARAYANA; BHASKAR, 2002).

A absorção percutânea de fármacos também tem sido aumentada por uma ampla variedade de ácidos graxos, sendo o mais popular o ácido oleico. Através de vários estudos com ácidos graxos como SPEs com diferentes cadeias de hidrocarbonetos, concluiu-se que cadeias alquílicas saturadas com comprimento de 10 e 12 carbonos ligadas a grupos de cabeça

polar fornecem um potente promotor (BARRY, 2012). Em contrapartida, para promotores de absorção contendo cadeias alquílicas insaturadas, cadeias de 18 carbonos aparentam ser ideais. Para estes compostos insaturados, espera-se que a configuração *cis* perturbe mais a estrutura dos lipídeos intercelular do que a configuração *trans*, uma vez que a última difere pouco do análogo saturado (GUTERRES, SÍLVIA S. *et al.*, 2007; BARRY, 2012)

Além disso, os ácidos graxos se mostraram promotores eficientes tanto para substâncias lipofílicas como hidrofílicas. Os ácidos graxos têm sido usados para melhorar a administração transdérmica, o estradiol, progesterona, o aciclovir, 5-fluorouracila e ácido salicílico, entre outros (BARRY, 2012).

Por exemplo, Santoyo e Ygartua empregaram ácido láurico (saturado), o ácido oleico (monoinsaturado), ácidos linoleico e linolênico (poliinsaturados) para promover o fluxo de piroxicam. O pré-tratamento do tecido com os ácidos graxos aumentou a quantidade de piroxicam retido no interior da pele e também diminuiu os valores de tempo de latência em cerca de três vezes (SANTOYO; YGARTUA, 2000).

A di-hidroergotamina (DHE) foi sugerida como potencialmente viável para a administração transdérmica. Na tentativa de aumentar a distribuição transdérmica do fármaco, três promotores, o ácido oleico, cloridrato de procaína e uréia, foram avaliados *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz. O ácido oleico foi o potenciador mais eficaz testado, tendo aumentado a absorção percutânea de DHE por 208 vezes. Verificou-se que o cloridrato de procaína e o ácido láurico reforçaram a absorção transdérmica de DHE por 2 a 3 vezes, respectivamente. Por outro lado, a formulação contendo ureia não mostrou qualquer diferença significativa em relação ao controle (NIAZY, 1991).

O ácido oleico demonstrou ser eficaz para dois fármacos, ácido salicílico e 5-fluorouracila, sendo que o fluxo de ácido salicílico aumentou 28 vezes e o fluxo de 5-fluorouracila aumentou 56 vezes através da membrana da pele humana *in vitro* (GOODMAN; BARRY, 1989). Esforços consideráveis têm sido dirigidos a investigar os mecanismos de ação do ácido oleico como promotor de absorção na pele humana. Fica claro a partir de inúmeros relatos na literatura de que os promotores interagem e modificam os domínios lipídicos do estrato córneo, e como seria de se esperar, para ácidos graxos de cadeia longa com uma configuração *cis* obtiveram-se os melhores resultados (BARRY, 2012).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar NPs proteicas a partir de zeína para permeação cutânea de (-)-T4OL.

1.2.2 Objetivos Específicos

- I. Preparar NPs de zeína utilizando a técnica de dessolvatação;
- I. Estabelecer os parâmetros de controle do processo de obtenção de NPs de zeína tais como, concentração de zeína, concentração de surfactante, concentração do ativo, proporção do solvente, velocidade e tempo de agitação;
- II. Caracterizar a morfologia das NPs obtidas através de técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS);
- III. Avaliar a EE de T4OL nos diferentes sistemas utilizando zeína como matriz polimérica;
- IV. Estudar a estabilidade cinética das dispersões de NPs obtidas por meio de medidas de pH, distribuição de tamanho, potencial zeta (ζ) e perda do T4OL (lixiviação) das NPs para a fase aquosa durante o período de armazenamento;
- V. Avaliar a liberação, permeação e retenção cutânea do T4OL encapsulado a partir dos diferentes sistemas, através dos cálculos dos parâmetros de permeabilidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A zeína, composta por quatro classes, α -zeína (19 kDa e 22 kDa), β -zeína (16 kDa e 14 kDa), γ -zeína (27 kDa) e δ -zeína (10 kDa), foi utilizada como biopolímero para preparação das NPs. Os surfactantes utilizados foram o Pluronic F-68 (F68) é um copolímero em bloco formado por poli-óxido de etileno–poli-óxido de propileno–poli-óxido de etileno [(PEO)₇₆ - (PPO)₂₉ - (PEO)₇₆], com $M_w \approx 8400$. É comercialmente disponível como polímero anfifílico não iônico. O Tween 80 (T80) com $M = 1310 \text{ g mol}^{-1}$. Também foram utilizados como estabilizantes três surfactantes catiônicos, o brometo *n*-tetradecil trimetilamônio (TTABr), com $M = 336 \text{ g mol}^{-1}$, o brometo *n*-dodecil trimetilamônio (DTABr) com $M = 308 \text{ g mol}^{-1}$ e brometo *n*-hexadecil trimetilamônio (HTABr) com $M = 364 \text{ g mol}^{-1}$, foram empregados como estabilizantes na formação de NPs. O T4OL (Figura 6), com massa molar de 154 g mol^{-1} , foi utilizado na encapsulação nas NPs. A CS (Figura 7) com massa molar numérica média de aproximadamente $M = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ e com grau de desacetilação de 75 a 85% foi utilizada para revestir as NPs. O *R*(+)-limoneno ($M = 136 \text{ g mol}^{-1}$), ácido oléico ($M = 282 \text{ g mol}^{-1}$) e propilenoglicol ($M = 76 \text{ g mol}^{-1}$) foram utilizados como promotores de permeação.

Para o estudo da liberação *in vitro* foi utilizada a membrana de acetato de celulose regenerada, com diâmetro de corte de 3500 Da. No estudo de permeabilidade foram utilizadas peles de orelhas suínas, que foram obtidas em um abatedouro local situado na cidade de Antônio Carlos, SC. Uma solução tampão (PBS) pH 7,4 (2,38 g de Na₂HPO₄; 0,19 g de KH₂PO₄ e 8,0 g de NaCl por litro de H₂O ultrapura, ajustada com ácido fosfórico para pH 7,4) foi preparada.

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como obtidos. Os solventes utilizados foram etanol e acetonitrila (Vetec; ambos em grau HPLC) e água Milli-Q (Billerica, MA, USA). Quando necessário, os solventes foram degaseificados em um ultrassom, sob vácuo, por 30 min.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Otimização do experimento para obtenção de NPs de zeína

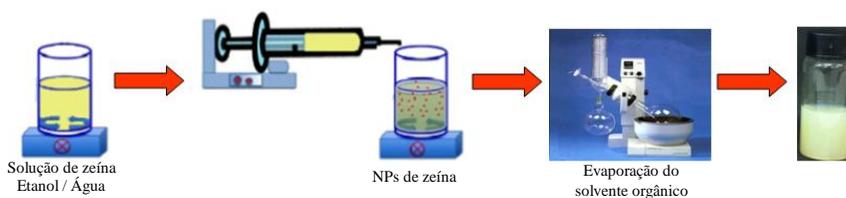
As nanopartículas foram preparadas por dois métodos:

Primeiramente as nanopartículas foram preparadas através do método de dispersão líquido-líquido, como sugerido por Zhong e Jin com pequenas modificações (ZHONG; JIN, 2009). A solução protéica foi preparada pela solubilização da zeína em etanol 85% ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta solução foi então dispersa sobre a solução aquosa na presença de surfactante F68 (1% da fase aquosa) sob diferentes velocidades de agitação de 3500 a 10000 rpm.

As NPs de zeína também foram preparadas utilizando o processo de precipitação em antissolvente (dessolvatação). A zeína na concentração de $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi dissolvida em mistura binária de solventes etanol/água (85:15 v/v). Esta solução foi então gotejada (3 mL da solução de zeína) a uma taxa constante de 6 mL h^{-1} em 9 mL da solução aquosa sob agitação magnética de 500 a 1000 rpm na presença de surfactante F68 (1% da fase aquosa). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação em rotavapor sob vácuo (Figura 7).

Após a determinação das melhores condições para obtenção das NPs de zeína foram testados os surfactantes T80, F68, TTABr, DTABr e HTABr em diferentes concentrações.

Figura 7 - Método da preparação das NPs de zeína.



Fonte: Adaptado de (BRAHATHEESWARAN DHANDAYUTHAPANI, 2012)

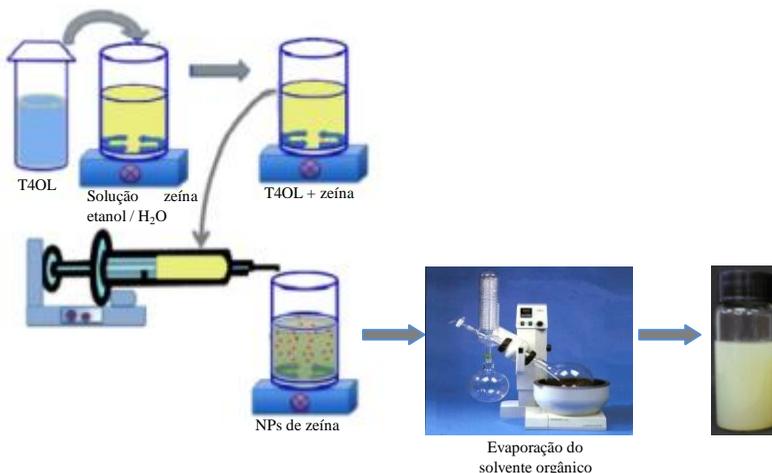
2.2.2 NPs de zeína com encapsulação do T4OL na presença e ausência de promotores de permeação (SPEs)

As suspensões de NPs de zeína carregadas com T4OL foram preparadas utilizando o processo de precipitação em antissolvente (dessolvatação). Neste processo, $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de zeína foram inicialmente

dissolvidas em um solvente binário etanol/água (87:13) e em seguida T4OL (100% m/m de zeína) e T4OL + SPEs (20% m/m de zeína) foram adicionados individualmente. Os SPEs estudados foram *R*-(+)-limoneno, propilenoglicol e ácido oleico. Os sistemas foram determinados como: B1 para NPs com T4OL encapsulado, na presença dos SPEs de B2 com propilenoglicol; B3 com limoneno e B4 com ácido oleico.

A solução resultante foi, em seguida, homogeneizada durante 30 min. Para cada amostra, 3 mL de solução foram gotejadas a uma taxa constante de 6 mL h^{-1} em 9 mL da solução aquosa contendo concentrações diferentes do surfactante TTABr, sob agitação magnética a 1000 rpm. O solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida, conforme esquematizado na Figura 8.

Figura 8 - Método da preparação das NPs de zeína para encapsulação do T4OL.



Fonte: Adaptado de (BRAHATHEESWARAN DHANDAYUTHAPANI, 2012)

2.2.3 NPs de zeína com encapsulação do T4OL e/ou revestida com quitosana

As suspensões de NPs de zeína foram preparadas conforme o item 2.2.1. Neste processo, 5 mg mL^{-1} de zeína foram inicialmente dissolvidas em etanol 87%. Em seguida, T4OL (100% m/m de zeína) foi então adicionado. A solução resultante foi, em seguida, homogeneizada durante 30 min. Para cada amostra, 3 mL desta solução de zeína contendo T4OL foi

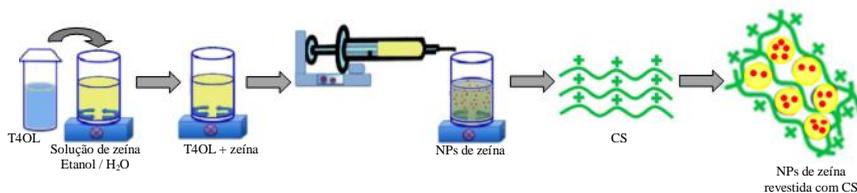
gotejada a uma taxa constante de 6 mL h^{-1} em 9 mL da solução aquosa contendo Pluronic F-68 ($0,5 \text{ g}/100\text{g}$ de fase aquosa) como estabilizante, sob agitação magnética a 1000 rpm . Na Tabela 1 está representada a composição de cada sistema. O solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida, utilizando um rota evaporador.

As suspensões de NPs revestidas foram preparadas utilizando o mesmo procedimento que as NPs carregadas com T4OL. O revestimento das NPs com a CS foi obtido pela mistura simples da suspensão das NPs, com uma solução do polissacarídeo, em concentrações distintas (Figura 9). A solução de CS foi preparada em 1% (v/v) de ácido acético sob agitação magnética à temperatura ambiente, até a completa dissolução.

Tabela 1 - Composição das NPs de zeína.

Amostras	Zeína (mg mL^{-1})	T4OL (% m/m)	F-68 (% v/v)	Fração CS / zeína (% m/m)	pH
A1	5,0	-	0,5	-	5,6
A2	5,0	-	0,5	-	6,5
A3	5,0	100	0,5	-	5,6
A4	5,0	100	0,5	-	6,5
A5	5,0	100	0,5	0,15	3,8

Figura 9 - Método da preparação das NPs de zeína para encapsulação do T4OL com revestimento de CS.



Fonte: Adaptado de (BRAHATHEESWARAN DHANDAYUTHAPANI, 2012).

2.2.4 Determinação da EE do T4OL nas suspensões de NPs

A quantificação do T4OL nas amostras foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu LC-10A incluindo uma bomba LC-10AD, equipado com um detector UV/VIS SPD-10AV, unidade controladora SCL-10Av, injetor de amostras Rheodyne 7125 e estação de trabalho Class VP. As análises foram realizadas em sistema de fase reversa e modo isocrático, nas seguintes condições: a fase

móvel utilizada foi acetonitrila:água (55:45, v/v); coluna Agilent Zorbax Eclipse C18 (XDB, 150 mm × 4,6 mm, com um tamanho de partícula de 5 µm e tamanho de poro de 100 Å) e uma pré-coluna (4,0 mm × 2,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica foram usadas aplicando uma taxa de fluxo de 1,3 mL min⁻¹, volume de injeção correspondente a 20 µL e detecção no UV em 200 nm. A metodologia utilizada baseia-se no método desenvolvido por Nielsen e Nielsen (2006) e validado previamente MACCARI, F. L. R. (2011).

2.2.5 Curva de calibração para determinação da concentração do T4OL

Para construção da curva de calibração foram preparadas oito soluções de T4OL em concentrações na ordem crescente, iguais a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 e 100 µg mL⁻¹, em balões volumétricos de 5 cm³. Em seguida, as amostras foram injetadas e as leituras foram realizadas à temperatura de 25 °C. A partir do cromatograma, foram obtidas as áreas no comprimento de onda (λ) de 200 nm. O procedimento foi realizado em triplicata. As áreas médias, correspondentes a três determinações para cada diluição de T4OL, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg mL⁻¹), no eixo das abscissas, para a obtenção da equação da reta.

2.2.6 Doseamento do T4OL nas suspensões aquosas de NPs

Após o preparo das suspensões de NPs, as amostras foram submetidas a um procedimento de ultrafiltração/centrifugação a 4000 rpm por 30 min utilizando uma membrana de filtração Amicon-Ultra-0,5 (celulose regenerada, corte (NMWL) de 100 kDa, Millipore Corp., USA). O sobrenadante foi removido, diluído em 87% de etanol e analisado quanto ao teor T4OL por CLAE nas condições descritas em 2.2.4. A EE (%) foi calculada pela diferença entre a quantidade de T4OL adicionado à solução de zeína e a quantidade presente no sobrenadante (não encapsulada).

2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

As suspensões de NPs de zeína foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula, PDI, ζ e morfologia. Nas seções seguintes são descritos os métodos utilizados para (i) determinação do tamanho e PDI das NPs; (ii)

determinação do ζ das NPs; (iii) TEM, (iv) determinação do pH da dispersão e (v) DLS e SLS.

2.3.1 Determinação do tamanho e PDI das NPs

A determinação da distribuição de tamanho e PDI das NPs de zeína foi realizada a 25 °C utilizando medidas de DLS. Para esta determinação foi utilizado um equipamento Zetasizer Nano da Malvern do Laboratório de Catálise Biomimética do Departamento de Química - UFSC. O instrumento operou com laser de He-Ne, $\lambda = 633$ nm e a detecção foi feita em um único ângulo de 173°. O diâmetro médio das partículas coloidais em suspensão foi determinado em triplicata, sendo que cada medida foi composta por 3 corridas.

2.3.2 Determinação do ζ das NPs

As medidas do ζ das NPs foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano da Malvern (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25 °C. O instrumento opera com laser de He-Ne, $\lambda = 633$ nm e a detecção foi feita em um único ângulo de 173°. O potencial de superfície das NPs foi determinado por medidas da mobilidade electroforética (U_E). Os valores foram convertidos em ζ (mV) utilizando a relação de Smoluchowski, num campo elétrico de 150 V cm⁻¹, conforme a equação de Henry (Equação 1),

$$\zeta = \frac{3 \eta U_E}{2 \varepsilon f(Ka)} \quad (1)$$

Sendo η o índice de refração, ε a constante dielétrica e $f(Ka)$ a função de Henry, que foi calculada como sendo 1,5, utilizando a aproximação de Smoluchowski.

Todas as medidas de ζ foram realizadas com suspensões diluídas das NPs utilizando uma média de três determinações.

2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A TEM é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de NPs, fornecendo informação visual direta da morfologia, do tamanho, dispersão e a forma de sistemas nanoparticulados em solução. A preparação da amostra consistiu na deposição de 4 μ L da amostra, a uma diluição previamente estimada, sobre grades de cobre revestidas com uma fina camada de carbono. As amostras foram secas por 24 horas à temperatura

ambiente antes da análise. As imagens das amostras foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM com voltagem de aceleração máxima de 100 kV, operando a 80 kV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.3.4 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado utilizando um peagômetro modelo PHS-3B da Phtek, previamente calibrado com soluções-tampão em pH 4,0, 7,0 e 10. As medidas foram realizadas através da inserção direta do eletrodo.

2.3.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS)

A distribuição de tamanho, bem como o tamanho médio das partículas e o PDI das suspensões de NPs foram determinados por DLS e SLS, utilizando um goniômetro ALV-CGS 8F S/N 069, equipado por quatro detectores, com faixa de detecção de 32° a 150° e operando com um laser de 22 mV He-Ne em um comprimento de onda de 632,8 nm. A dependência angular do espalhamento de luz dinâmico $I=I(q,t)$ e do espalhamento de luz estático $I=I(q)$ das amostras foram observadas em ângulos que variaram entre 40° e 140°, em intervalos de 10°, durante 300 s para cada ângulo. Para os experimentos, 1 mL de cada suspensão (em diluições previamente estimadas) e com temperatura constante de $25,0 \pm 0,1$ °C foram analisadas em cubetas cilíndricas (SCHÄRTL *et al.*, 2007). Todas as amostras foram filtradas com filtro de PTFE, 0,45 µm (Rotilabo-Spritzenfilter, unsteril). O raio hidrodinâmico (R_H) das NPs em suspensão foi obtido a partir da análise CONTIN, usando a equação 2 de Stokes-Einstein.

$$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (2)$$

Esta técnica foi realizada através de colaboração com o *Centre de Recherche sur les Macromolecules Vegetales* (CERMAV) em Grenoble, na França. As análises foram realizadas pela doutoranda Tatiane Popiolski.

2.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE CINÉTICA DAS SUSPENSÕES

A suspensão de NPs contendo T4OL foi submetida a um estudo de estabilidade preliminar, através da análise das NPs imediatamente após o preparo (tempo zero) e após 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 30 dias de armazenamento. As amostras foram submetidas às condições de temperatura ambiente (25 °C) sendo avaliadas visualmente quanto ao seu aspecto macroscópico (cor, odor, precipitações e separação de fases), análises de pH, tamanho, PDI, ζ e perda do T4OL (lixiviação) das NPs para a fase aquosa conforme metodologias descritas no item 2.3. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

2.5 LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Neste trabalho, após a caracterização físico-química das NPs foi realizado o estudo de liberação, permeação e retenção cutânea, de modo a avaliar a dose do composto ativo que ficaria retida na pele e a forma de liberação da formulação, visando assim garantir que o fármaco fique retido na concentração e local desejado. O estudo *in vitro* de liberação, permeabilidade e retenção cutânea foi realizado em câmaras de difusão de Franz dispostas em um banho termostatizado com agitação multiponto (Dist).

2.5.1 Estudo de liberação *in vitro* do T4OL

Os experimentos de liberação *in vitro* do T4OL foram realizados com membrana sintética de acetato de celulose (Spectra/Por[®]3; MWCO 3500 g mol⁻¹) usando-se o modelo da câmara de difusão de Franz (Figura 10) com um volume de receptor de 10 mL e uma área de difusão de 1,77 cm². Uma solução tampão de PBS contendo 1% (m/v) de Tween 80 foi incluída como o meio receptor e o sistema foi continuamente agitado (\pm 800 rpm). O sistema foi mantido a 37 °C para simular as condições *in vivo*, com o auxílio de um banho termostatizado. As soluções com concentrações pré-definidas de cada formulação foram colocadas separadamente no compartimento doador. Em intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h, 400 μ L de cada amostra foram retirados do receptor e imediatamente substituídas com solução PBS/ Tween80 (para solubilização do fármaco). As concentrações de T4OL das amostras foram determinadas por CLAE. Para descrever o modelo cinético de liberação do T4OL nas formulações testadas, foram testadas equações cinéticas de ordem zero (quantidade de

T4OL liberado por área de difusão vs. função do tempo), de primeira ordem (log da quantidade de T4OL que permanece para ser liberado em função do tempo), Higuchi (quantidade de T4OL libertado por área de difusão vs. raiz quadrada do tempo) e Korsmeyer-Peppas. O modelo de Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER *et al.*, 1983; RICCI-JÚNIOR, 2011) fez o uso da Equação 3,

$$M_t/M_\infty = K t^n \quad (3)$$

Sendo que M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberado em relação ao tempo t , enquanto que n é o expoente liberado e K é fator de liberação. Plotado o $\log(M_t/M_\infty)$ como uma função de $\log t$ obtêm-se os valores de n e K (h^{-n}).

O critério para a escolha do modelo mais adequado foi baseado na análise de regressão linear ($> R^2$). Os resultados foram representados graficamente pela relação entre o percentual de fármaco liberado (%) em função do tempo (h). Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata.

Figura 10- Modelo da câmara de difusão de Franz.



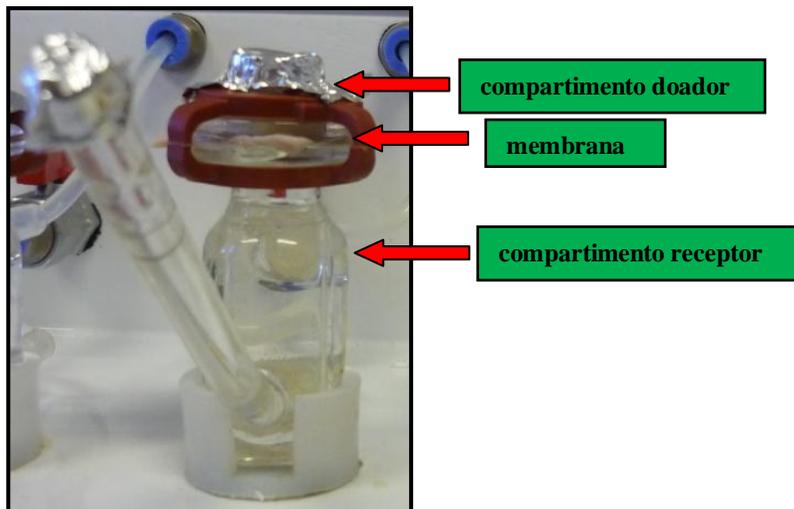
2.5.2 Estudos de permeação e retenção cutânea do T4OL

A permeabilidade do T4OL foi avaliada através do modelo *in vitro* da câmara de difusão de Franz (Figura 11). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC, acompanhada pelo doutorando Thiago Caon e sob supervisão da Profª Drª Cláudia Maria Oliveira Simões. Para tal, utilizou-se a pele de orelhas suínas como modelo

de membrana, devido à similaridade com a pele humana. Primeiramente a pele de orelhas suínas foi preparada como descrito por Caon *et al.* (2010).

Após o preparo, a mesma foi disposta na interface dos compartimentos doador e receptor da câmara com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme para o compartimento receptor. O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de solução tampão PBS contendo 1% de Tween 80, proporção esta definida de modo a obter uma condição *sink*. No compartimento doador foram colocados 2 mL da solução aquosa de T4OL ou suspensão da NP onde o fármaco foi incorporado. A solução no compartimento receptor foi mantida à temperatura de 37 °C com o auxílio de um banho termostatizado e sob agitação magnética constante (cerca de 800 rpm) com o objetivo de manter a concentração do fármaco uniforme. Em intervalos regulares de 2 h, alíquotas de 400 µL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem lateral (com reposição de quantidade equivalente de solução) e imediatamente armazenadas a -20 °C até o momento da quantificação por CLAE. O tempo de duração do experimento foi definido como 10 h. Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata. Na sequência, efetuou-se o cálculo de parâmetros de permeabilidade. Estes cálculos foram feitos fundamentando-se nas leis de Fick e os resultados foram representados graficamente pela relação da quantidade permeada (%) em função do tempo (h). Ao final do experimento, efetuou-se um balanço de massa final, em que foram confrontadas a quantidade de fármaco permeada, retida e remanescente no compartimento doador. A retenção do T4OL na epiderme e na derme foi avaliada e separou-se a derme da epiderme. Essas foram colocadas separadamente em tubos contendo 3,0 mL de etanol 87% (líquido extrator) e mantidas em repouso por 24 h. Após este período, os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação (Vortex, 5 min) para o rompimento das células e aumento na eficiência de extração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remoção de interferentes da pele e quantificadas por CLAE.

Figura 11- Câmara de difusão de Franz.



2.5.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, três repetições independentes. A comparação entre os diferentes valores de tempo de latência e dos coeficientes de permeabilidade obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA), incluindo testes de comparações múltiplas (Tukey). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de um sistema nanoparticulado, preparado a partir de polímero biodegradável (zeína), foi dividido em três partes.

Na primeira parte, foi realizada a otimização do processo para preparação das NPs, tais como: a escolha do solvente orgânico empregado, a variação do pH, a concentração de zeína, a taxa de gotejamento e velocidade e tempo de agitação. Tais parâmetros foram cuidadosamente estabelecidos a fim de se obter nanoestruturas com estreita distribuição de tamanho, baixa polidispersidade e boa estabilidade. Também foi realizado um estudo para determinar a concentração ideal de alguns surfactantes utilizados.

Na segunda parte, é descrita a preparação de NPs de zeína, utilizando como estabilizante o TTABr. Estes sistemas foram testados quanto à viabilidade para a encapsulação do ativo lipofílico, o T4OL, como possível medicamento de uso tópico para o tratamento do melanoma. Agentes que auxiliam na penetração de princípios ativos na pele, tais como o limoneno, propilenoglicol e ácido oleico, foram adicionados ao sistema e sua influência nas propriedades das NPs foi avaliada. Serão reportados estudos demonstrando a EE, as características físico-químicas das NPs após a encapsulação do ativo, bem como um estudo do seu comportamento como sistemas de liberação controlada através de estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*.

Na última etapa do estudo, foi realizada a preparação e caracterização de NPs de zeína para a encapsulação do T4OL em diferentes valores de pH, revestidas ou não com quitosana, utilizando o F-68 como estabilizante. Também foram realizados estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*.

3.1 NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA

3.1.1 Otimização do experimento para obtenção de NPs de zeína

A formação de NPs pode ser influenciada por diversos fatores, como a concentração de polímero e surfactante, o tempo e velocidade de agitação, etc. Desta forma, as condições experimentais foram cuidadosamente estabelecidas a fim de se obter nanoestruturas com diâmetro médio baixo, baixa PDI e alto ζ . Estas características foram principalmente acompanhadas por medidas de DLS e TEM, que fornecem informações relevantes, como tamanho das partículas em suspensão, presença de agregados, polidispersão, estabilidade e características morfológicas.

PARRIS (2005) preparou NPs de zeína para encapsulação de três óleos para aplicação em alimentos, utilizando método com alta velocidade. A solução de zeína na presença ou ausência dos óleos foi rapidamente dispersa com elevada velocidade de mistura com água contendo 0,01% de fluido de silicone, até que uma fase única foi formada (aproximadamente 1 minuto). Foram obtidas partículas de forma irregular e tamanho médio de 100 nm (PARRIS, N. 2005). Zhong e colaboradores estudaram o encapsulamento do óleo de peixe em NPs de zeína, por um método semelhante ao de Parris (2005), tendo obtido NPs com tamanho variando de 350 - 450 nm e com alto desvio padrão (ZHONG *et al.*, 2009). Zhong e Jin (2009), baseando-se nos estudos de Parris (PARRIS, N. 2005), estudaram o efeito na preparação das NPs de zeína em diferentes velocidades (5000, 10000 e 15000 rpm), sendo que homogeneização à velocidade mais baixa (5000 rpm) levou a melhores resultados, com NPs esféricas e com distribuição do tamanho estreita (ZHONG; JIN, 2009).

Desta forma, com base nos estudos mencionados acima, o trabalho aqui apresentado envolveu inicialmente a preparação das NPs através do método de dispersão líquido-líquido, com velocidades altas de 3500, 5000 e 10000 rpm. Foram obtidas NPs de zeína com diâmetros variando de $250 \pm 7,4$ nm a $506 \pm 9,8$ nm e com PDI na faixa de 0,3-0,5. Os resultados também se apresentaram melhores quando utilizados com menor velocidade (3500 rpm).

Os resultados obtidos por TEM corroboram com os resultados obtidos por DLS. A micrografia de TEM revelou a formação de NPs esféricas irregulares (Figura 12 e 13). O alto desvio padrão dos valores do tamanho determinado por DLS, acompanhado do elevado valor de PDI corroboram com a imagem visualizada dos agregados proteicos em solução.

Figura 12- NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 5000 rpm.

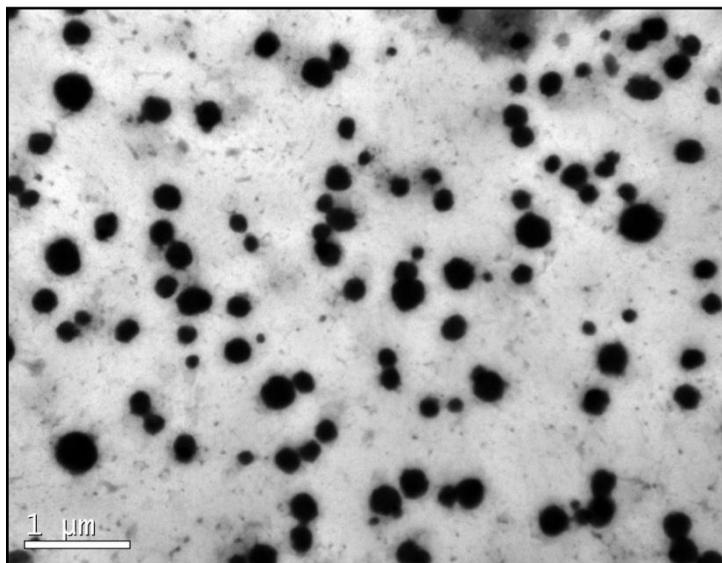
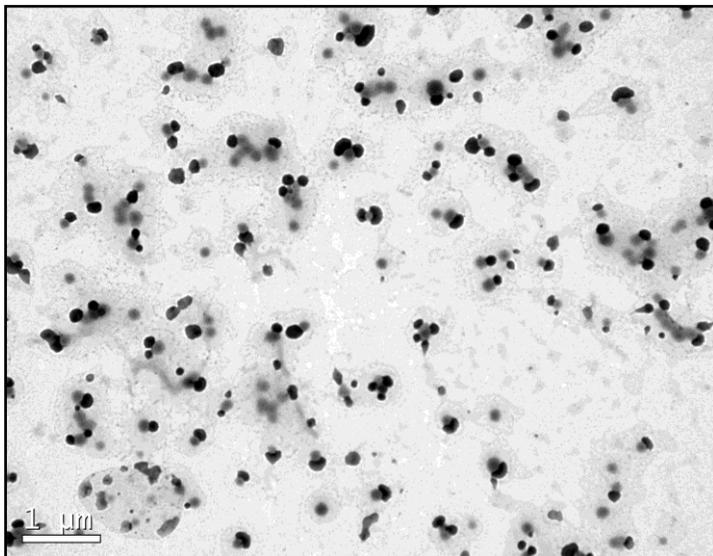


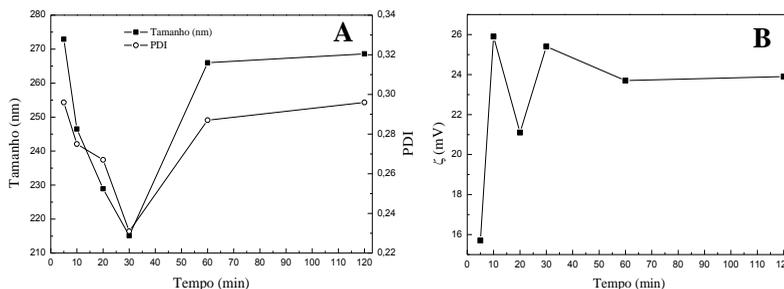
Figura 13- NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 3500 rpm.



Dessa forma, as NPs de zeína também foram obtidas através do processo de dessolvatação seguida da evaporação do solvente. A solução concentrada de 20 mg mL^{-1} de zeína dissolvida em etanol a 85 % e 1% de F68 foi utilizada para estudar o efeito na produção das partículas. Primeiramente, para efeito de comparação, a preparação foi realizada em duas velocidades do rotor durante a homogeneização, isto é, 500 rpm e 1000 rpm em diferentes tempo de gotejamento, conforme apresentado nas Figuras 15 e 16.

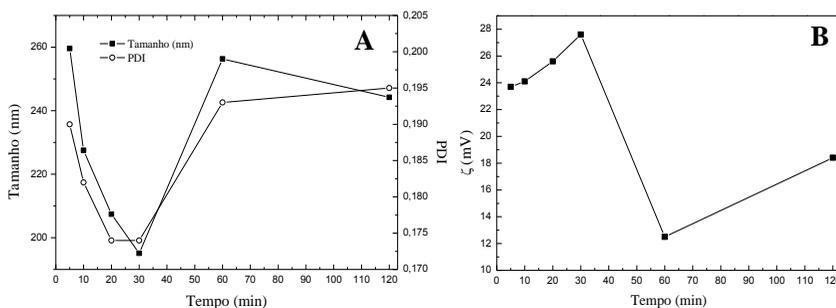
Quando se utilizou velocidade de 500 rpm observou-se uma diminuição no tamanho e na PDI com aumento do tempo de gotejamento até 30 min. Após este tempo o tamanho e PDI voltaram a aumentar. Já com relação ao ζ , os melhores resultados foram obtidos com 10 e 30 min. Nestes tempos o sistema apresentou maior estabilidade com carga de 25,9 mV (Figura 14B). Em relação ao tamanho, o melhor resultado foi obtido no tempo de 30 min, com a obtenção de NPs com 215 nm e PDI = 0,23 (Figura 14A).

Figura 14 - Tamanho e PDI (A) e ζ (B) das NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 500 rpm.



Com velocidade de homogeneização de 1000 rpm, foi também observada uma diminuição do tamanho e PDI com aumento de gotejamento até 30 min. Neste caso foram obtidas NPs com tamanho de 195 nm, PDI = 0,17 e ζ de 27 mV (Figuras 15 A e B). Comparando-se as duas velocidades utilizadas, com 1000 rpm as NPs apresentaram uma maior estabilidade e distribuição mais estreita de tamanho.

Figura 15 - Tamanho e PDI (A) e ζ (B) das NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 1000 rpm.



As imagens de TEM (Figuras 16 e 17) corroboram com os valores de tamanho determinados por DLS, sendo possível confirmar por imagens a formação de NPs de tamanho maiores na velocidade de homogeneização de 500 rpm. Nesta velocidade foi observada a formação de NPs de zeína assimétrica, inclusive com a presença de agregados de partículas (Figura 17). A formação destes agregados é confirmada tanto pelos valores maiores

do diâmetro e alta PDI (determinados por DLS), como pelas imagens via TEM.

A formação de NPs esféricas sólidas, com bordas bem definidas, foi observada quando a preparação foi realizada com velocidade de 1000 rpm (Figura 17). A imagem de TEM referente à estabilização ainda mostra a presença de alguns aglomerados, cuja formação se deve provavelmente a uma quantidade excessiva de surfactante, sugerindo que a estabilização pode ser alcançada em menores concentrações de F68.

Figura 16 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 500 rpm e tempo de gotejamento de 30 min.

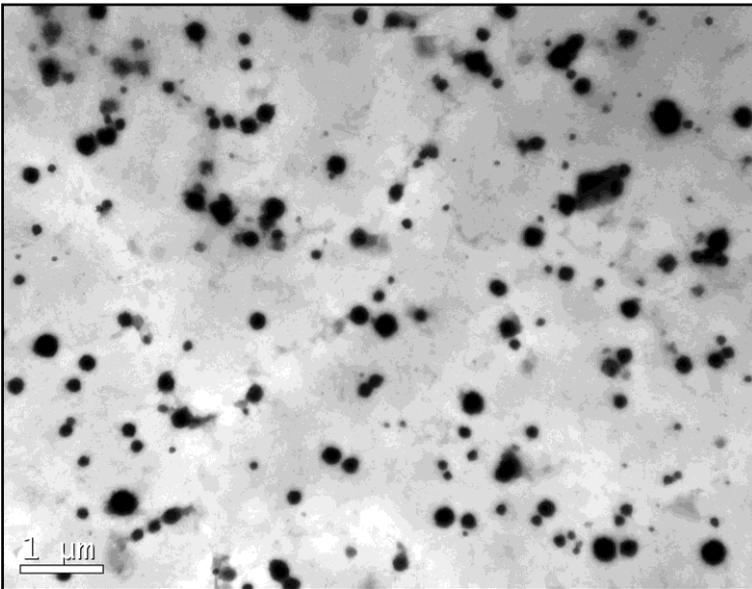
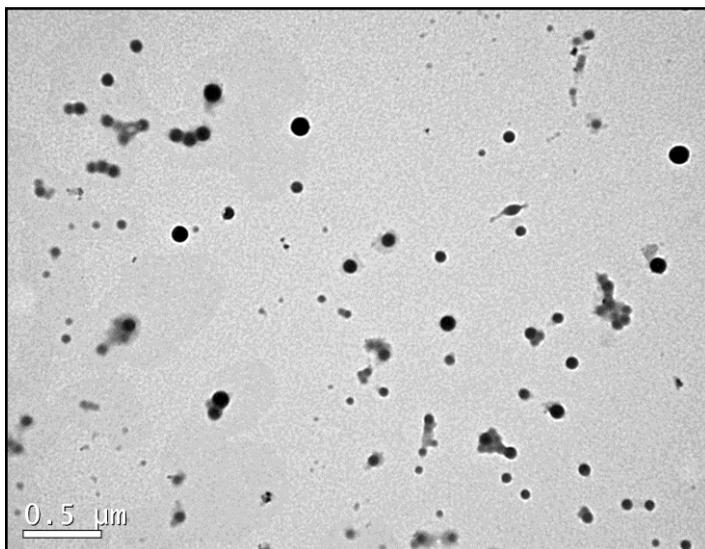


Figura 17 - NPs de zeína com velocidade de homogeneização de 1000 rpm e tempo de gotejamento de 30 min.



A partir destes resultados a velocidade de 1000 rpm e tempo de gotejamento de 30 min foram selecionados para a preparação das NPs na forma de nanoesferas, sendo essas condições utilizadas em todos os experimentos realizados ao longo desta tese.

3.1.2 Efeito do solvente na preparação das NPs de zeína

De acordo com Kim e Xu (2008) (KIM, S.; XU, 2008), moléculas de zeína tendem a agregar-se dependendo da composição do solvente, sendo que as composições 85/15 e 87/13 (etanol/água) apresentaram o menor número de moléculas agregadas, 600 e 50, respectivamente. Desta forma, foi avaliada a influência da composição do solvente no tamanho, PDI e também no ζ de NPs de zeína. Diversas proporções etanol/água foram utilizadas para dissolver a zeína (20 mg mL^{-1}) e os resultados estão demonstrados na Figura 18. Em geral, as NPs obtidas tiveram um diâmetro entre 200 e 250 nm, sendo que para composições 85/15 e 87/13, obtiveram-se partículas com 202 nm e 198 nm de diâmetro, respectivamente. A composição 95/5 apresentou um tamanho de partícula de 10 nm, as quais podem ser atribuídas à formação de micelas. A zeína se dissolveu completamente nesta composição (95/5), entretanto aglomerou-se durante o

processo de dispersão, formando grandes grumos visíveis a olho nu (Figura 19). Pode-se então sugerir que como estas concentrações são muito próximas, a mínima alteração promove a agregação de um grande número de moléculas com a consequente deposição das partículas maiores, o que pode ter sido a causa do aumento da PDI destas amostras. O PDI das amostras variou significativamente com a composição do solvente (Figura 18 B). No entanto, quando se utilizou a composição 87/13, o PDI das amostras caiu drasticamente em relação às outras composições, sendo inclusive menor que o PDI das amostras dissolvidas com 85/15 etanol/água. O mesmo comportamento pode ser observado com relação ao ζ que apresentou um valor de 29 mV com a composição 87/13. Este fato nos levou a utilizar esta composição de solvente nos experimentos seguintes.

Figura 18 - Influência da composição do solvente (A) no tamanho, (B) no PDI e (C) ζ de NPs de zeína.

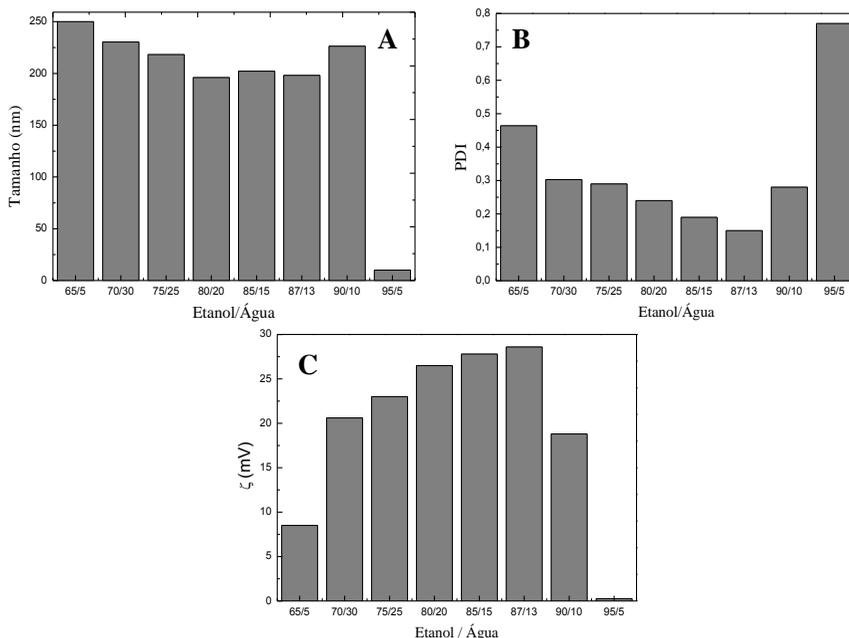
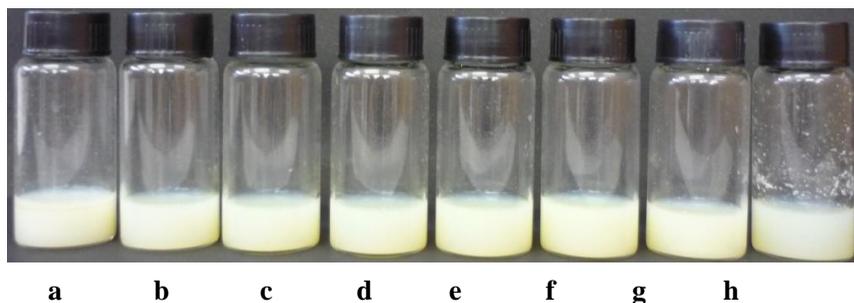


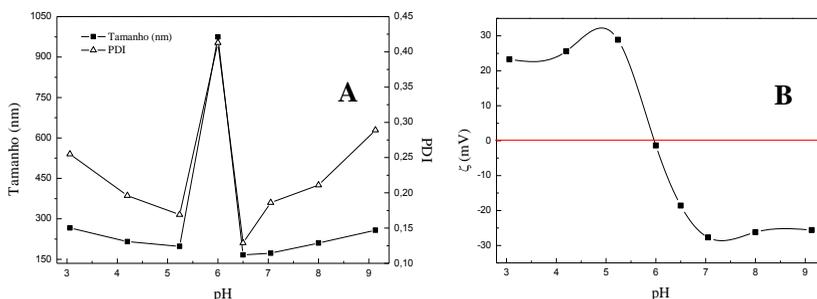
Figura 19 - NPs de zeína com diferentes composições do etanol: (a) 65% (b) 70% (c) 75% (d) 80% (e) 85% (f) 87% (g) 90% (h) 95%.



3.1.3 Influência do pH na preparação das NPs

Para estudar o efeito do pH na cinética de precipitação de NPs de zeína, o pH da fase aquosa foi variada durante a preparação das nanopartículas (Figura 20). O tamanho e PDI das NPs de zeína foram elevados nas condições de mais baixo e mais alto pH testado. Em pH 3 e 9, os tamanhos das partículas foram de 266 nm e 257 nm e PDI de 0,26 e 0,29, respectivamente (Figura 20A). NPs menores (166 nm) e com PDI baixo (0,13) foram obtidas a pH 6,5. Resultados similares foram obtidos em pH 5,3. Estes resultados sugerem que a faixa de pH ideal está em 5,3 e 6,5 pois as NPs apresentam tamanho e PDI menores. O efeito do pH sobre a partícula de agregação foi estudado também através da dispersão de NPs de zeína com avaliação do seu ζ (Figura 20B). O ζ foi positivo para pH < 5,3 e negativo na faixa de pH 5,3-6,5. Houve boa estabilidade para ζ em pH 5,3. Para as NPs de zeína preparadas em pH próximo do ponto isoelétrico de zeína (PI = 6,2), menores tamanhos e menor PDI foram observados.

Figura 20 - Variação do tamanho, PDI (A) e ζ (B) em função do pH das NPs de zeína.



3.1.4 Influência do surfactante

Para estudar o efeito dos surfactantes sobre a preparação das NPs de zeína uma classe apropriada de agentes tensoativos foi utilizada. Com este propósito, dois surfactantes não iônicos, T80 e F68 e três surfactantes catiônicos, o DTABr, HTABr e o TTABr foram utilizados individualmente em diferentes concentrações [0,1% a 1,5% (m/m)].

A Tabela 2 apresenta as melhores condições em termos de concentração obtidas para cada surfactante utilizado. Todos os surfactantes utilizados se mostraram viáveis para estabilização de NPs de zeína. No que diz respeito aos surfactantes não iônicos (T80 e F68), estes apresentaram tamanho de partículas na faixa de 190-230 nm e com PDI de 0,15-0,23. Os surfactantes não iônicos não apresentaram diferença significativa em relação ao tamanho, porém em relação a PDI e ζ o F68 apresentou melhor estabilidade.

Tabela 2 - NPs de zeína estabilizada com diferentes surfactantes.

Surfactante	T80	F68	DTABr	HTABr	TTABr
Concentração (% m/m)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tamanho (nm)	210,3	193,2	215	220	196,3
PDI	0,18	0,15	0,25	0,24	0,14
ζ (mV)	23	28	35	35	39

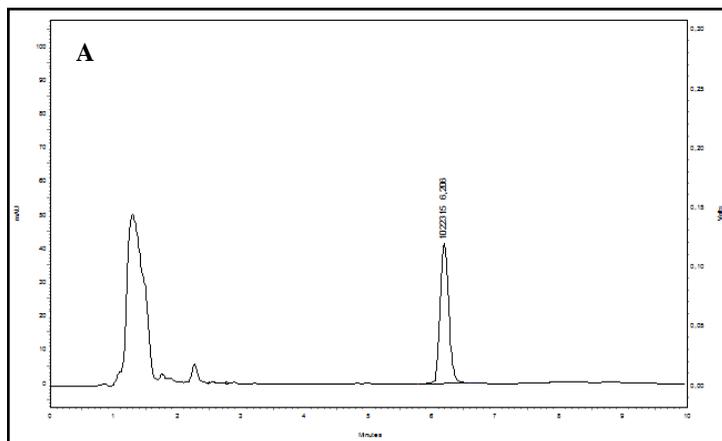
Para os surfactantes catiônicos (DTABr, HTABr e TTABr), o tamanho das partículas foi de 195-250 nm e PDI de 0,14-0,3, sendo que o TTABr apresentou melhores condições em relação ao tamanho, PDI e ζ .

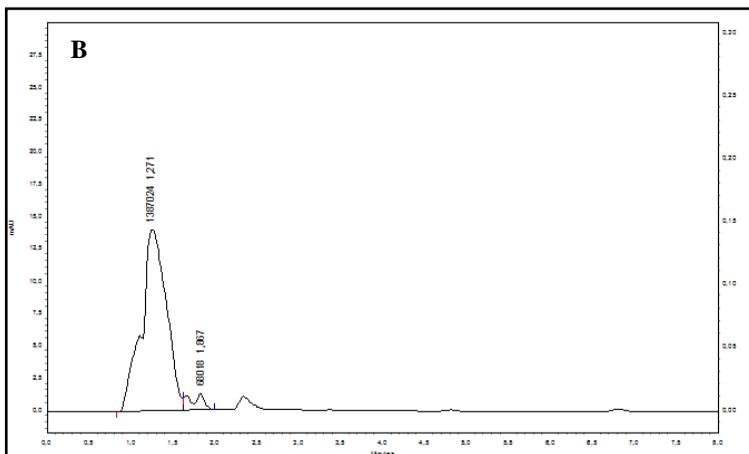
3.2 NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM PROMOTORES DE PERMEAÇÃO PARA LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO TERPINEN-4-OL

3.2.1 Teste de especificidade

O teste de especificidade foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.5 para eliminar possíveis interferentes dos compostos presentes na formulação para quantificação do ativo. As Figuras 21 A e 21 B apresentam as leituras no CLAE do T4OL e dos constituintes da formulação. Nas condições experimentais otimizadas o cromatograma do T4OL apresenta um único e definido pico do fármaco com tempo de retenção em aproximadamente 6 minutos. O método analisado mostrou especificidade, pois nenhuma interferência foi detectada em 200 nm, nas condições cromatográficas empregadas.

Figura 21 - Injeção do T4OL (A) e dos compostos da formulação (B).





3.2.2 Construção da curva de calibração

A curva de calibração do T4OL foi construída segundo metodologia descrita no item 2.2.5, ocorrendo linearidade na faixa de concentração de 5,0 a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação (R) de 0,9993. A equação da reta média de quatro curvas de calibração, determinada através da regressão linear, é $y = 28621x + 30973$. A curva apresentou o valor de R^2 dentro do requerido pela ANVISA (mínimo de 0,99) (ANVISA, 2003).

3.2.3 Caracterização Físico-Química das NPs

As NPs foram preparadas pelo processo de precipitação em antissolvente (dessolvatação) e as condições experimentais foram determinadas conforme descrito no item 3.1. A fim de otimizar as condições experimentais para a obtenção das NPs encapsuladas com T4OL, um planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} com amostras quadruplicadas no ponto central foi realizado, considerando zeína, T4OL e TTABr como fatores e o tamanho das partículas, PDI, o ζ e EE como respostas (Tabela 5). Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

A interpretação dos resultados foi simplificada considerando uma função de resposta (R_f) associada com as quatro respostas, em simultâneo, através da Equação 4, a qual foi aplicada a fim de proporcionar uma maior

resposta. Em outras palavras, R_f foi ajustado de tal maneira que o valor mais elevado obtido representa a melhor resposta global do sistema.

$$R_f = \frac{(\zeta + EE)}{(PDI * Tamanho)} \quad (4)$$

No presente caso, em termos de resposta, o experimento 7 foi o que apresentou o valor mais elevado, enquanto para o experimento 2 obteve-se o valor mais baixo (Tabela 3). As NPs de zeína apresentaram tamanho variando entre 119 -191 nm, PDI no intervalo de 0,09 - 0,32, além de valores de ζ na faixa de 33,5 mV a 57,7 mV e EE de 65,6 - 93,5 %.

Tabela 3 - Fatores, níveis e respostas para planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} .

Exp.	Zeína	Fatores			Respostas Individuais			R_f
		T4OL	TTABr	Tamanho	PDI	ζ	EE	
1	20	10	0,1	183,9	0,15	33,5	65,6	49,65
2	20	20	0,5	175,2	0,32	57,7	66,6	13,09
3	20	30	0,3	119,1	0,18	48,5	86,1	23,50
4	35	10	0,5	134,3	0,22	55,1	82,5	17,88
5	35	20	0,3	171,9	0,11	46,1	78,1	49,30
6	35	30	0,1	168,8	0,15	45,7	84,9	37,01
7	50	10	0,3	184,6	0,09	43,3	93,5	71,36
8	50	20	0,1	179,0	0,12	48,5	85,7	45,48
9	50	30	0,5	191,1	0,09	45,0	93,2	70,20
10	35	20	0,3	172,9	0,10	46,5	78,6	54,08
11	35	20	0,3	174,9	0,15	44,1	80,0	38,53
12	35	20	0,3	168,9	0,16	45,1	77,9	34,20

* Exp.: Experimentos, Zeína (mg. mL⁻¹), T4OL (% m/m de zeína), TTABr (% da fase aquosa)

A Tabela 4 mostra os coeficientes de regressão obtidos para o planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} com amostras quadruplicados no ponto central. De acordo com a análise estatística o fator TTABr (linear e quadrática) e de primeira ordem para a interação zeína * T4OL foram significativos dentro do intervalo de confiança de 95% ($p > 0,05$). A falta de ajuste não foi verificada para o modelo dentro do intervalo de confiança de 95%, já que a falta de teste de ajuste forneceu um valor de $p = 0,22$ (ANOVA). Portanto, uma superfície de resposta foi obtida para a zeína e

T4OL (Figura 22A), o que indica que a resposta aumenta quando ambos os elementos são mantidos em níveis elevados. Por outro lado, a resposta (Figura 22B) obtida para o TTABr e T4OL aumenta quando a concentração de TTABr é mantida fixa no ponto central e a de T4OL no nível baixo ou alto. Com base na análise de superfície de resposta, zeína, em uma concentração de 50 mg mL^{-1} e a percentagem de TTABr fixa a 0,3% em fase aquosa foram selecionadas como as condições experimentais para serem aplicadas a fim de estudar a influência da concentração do T4OL na estabilidade das NPs e EE.

Os resultados demonstraram que embora a concentração de zeína possua um efeito pronunciado na EE numa proporção direta, a sua solubilidade aparente está limitada a 50 mg mL^{-1} em etanol a 87%.

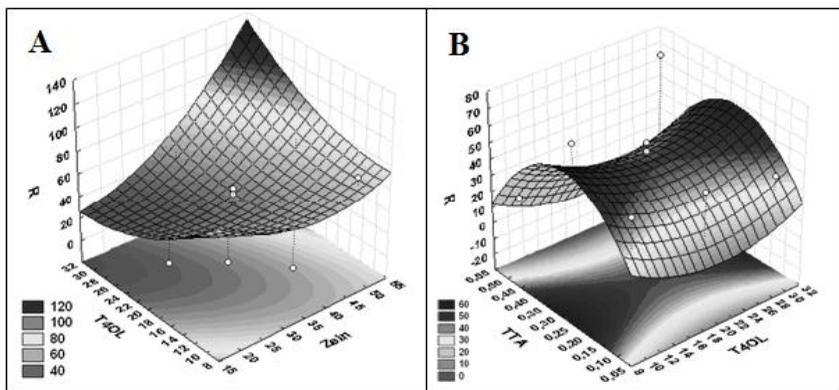
Em altas concentrações de zeína a formação de agregados ocorre, o que é indesejável em relação à sua aplicação na área biomédica, pois isso pode reduzir a atividade e solubilidade, induzindo também imunogenicidade e outras reações adversas (PAN *et al.*, 2009). Este fenômeno é comum em soluções de proteína, porque a solubilidade da proteína pode ser fortemente afetada pelo pH e força iônica do meio (RYAN *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Resultados obtidos do planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} .

Fator	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	p-valor
Constante	158,117	43,06	0,0357*
Zeína	-5,446	2,17	0,098
T4OL	-9,074	3,01	0,057
TTABr	383,937	114,63	0,044*
Zeína*Zeína	0,056	0,03	0,125
T4OL*T4OL	0,107	0,06	0,169
TTABr*TTABr	-682,900	188,45	0,036*
Zeína*T4OL	0,133	0,04	0,044*

* Fatores considerados significativos.

Figura 22 - Superfícies de resposta obtidas para T4OL com (A) zeína e (B) TTABr.



A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial, o melhor sistema foi determinado, sendo a concentração de zeína igual a 50 mg mL^{-1} , 10% de T4OL e 0,3% de TTABr. Como a concentração de T4OL era baixa, optou-se por variar a concentração do T4OL em relação à massa de zeína para se obter uma maior quantidade em massa de T4OL encapsulado e avaliar a influência em relação ao tamanho, PDI, ζ e EE.

Na Tabela 5 estão mostrados os resultados obtidos com a variação na concentração do T4OL. Os dados mostram que em relação ao tamanho apenas a suspensão de NP com encapsulação de 20% de T4OL foi superior e significativamente diferente das demais (ANOVA/ Tukey, $p < 0,05$). Já em relação ao PDI não existiram diferenças significativas entre as amostras (ANOVA/ Tukey, $p < 0,05$).

Quando o ζ das diferentes sistemas foram comparados entre si, observou-se que as suspensões de NPs com 10%, 60% e 100% de T4OL apresentaram valores superiores, ou seja, com uma boa estabilidade coloidal e foram significativamente diferentes em relação as outras suspensões, porém, em relação a EE apenas com 10% e 100% de T4OL foram superiores e significativas (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

Desta forma, os melhores resultados em relação ao tamanho, ζ e EE foram obtidos com 10 e 100% de T4OL. O sistema com 100% de T4OL foi selecionado, devido à maior quantidade de T4OL encapsulado, pensando-se nos estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*. A partir destes resultados, foi utilizado sistema composto de zeína (50 mg mL^{-1}), T4OL (100%) e TTABr (0,3%) para realização de outros estudos.

Tabela 5 – Influência do T4OL no tamanho, PDI, ζ e EE na formação das NPs de zeína (50 mg. mL⁻¹) utilizando 0,3% de TTABr.

[T4OL] (%)	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
10	184,6±1,4 ^a	0,09±0,01 ^a	43,4±0,6 ^c	93,5±0,2 ^c
20	196,0±2,6 ^b	0,11±0,01 ^a	36,2±1,5 ^{a,b}	78,7±0,7 ^b
40	185,5±3,2 ^a	0,12±0,01 ^a	37,5±1,6 ^{a,b}	83,5±0,6 ^a
60	182,7±2,1 ^a	0,11±0,01 ^a	40,3±0,6 ^{b,c}	83,1±0,9 ^{a,b}
80	181,9±3,0 ^a	0,12±0,01 ^a	34,4±1,6 ^a	81,0±1,3 ^a
100	185,1±2,4 ^a	0,10±0,01 ^a	39,7±2,0 ^{a,b,c}	91,4±0,6 ^c

Letras iguais na mesma coluna significam que não existem diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

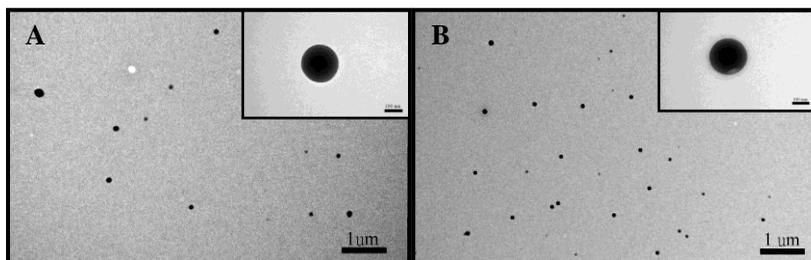
Também foi desenvolvida a suspensão sem o princípio ativo com o objetivo de comparar o comportamento do sistema nanoparticulado. NPs de zeína vazia com 50 mg L⁻¹ de zeína e 0,3% de TTABr foram obtidas apresentando tamanho médio de 200,3±0,49 nm, PDI de 0,093±0,024 e ζ de 40,7±0,5 mV.

Quando as NPs de zeína sem princípio ativo foram comparadas com o sistema com 100% de T4OL apenas o tamanho foi superior e significativamente diferente (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$).

Com o objetivo de confirmar o tamanho e verificar a morfologia das NPs de zeína a análise por TEM foi realizada e comparada com os dados obtidos por DLS. A morfologia apresentada pelas NPs de zeína e com a encapsulação de 100% de T4OL mostrou estrutura compacta esférica e com uma distribuição de tamanho estreita (Figura 23 A-B). O tamanho médio das NPs foi de 158 nm, sendo que as NPs com encapsulação do T4OL não apresentaram diferença no tamanho. A análise de TEM apontou para NPs com tamanho menor comparado com a técnica de DLS, com a qual se obtiveram tamanho médio das NPs de zeína na ausência e presença do T4OL de 200 nm e 185 nm, respectivamente.

As diferenças observadas entre as duas técnicas estão relacionadas ao processo de desidratação, uma vez que para a realização das análises de TEM foi necessária a secagem do solvente e para os ensaios de DLS as medidas foram feitas em solução.

Figura 23 - Micrografias obtidas por TEM das NPs de zeína vazia (A) e com T4OL (B) em maior e menor magnificação.



3.2.4 NPs de zeína com encapsulação do T4OL na presença dos SPEs

O emprego de sistemas de liberação de fármacos na pele tem crescido nas últimas décadas devido ao fato de possuírem uma série de vantagens tais como: administração do fármaco no sítio de ação, prolongamento da liberação do fármaco e melhora na penetração e na retenção do fármaco na pele, o que auxilia assim no tratamento de disfunções e patologias. A principal barreira à penetração de ativos na pele é o estrato córneo, sendo que uma vez vencida essa barreira o fármaco pode efetivamente melhorar a sua penetração e retenção na pele (GUTERRES, SÍLVIA S. *et al.*, 2007; SILVA, J. A. *et al.*, 2010).

Para minimizar a dificuldade na absorção cutânea de fármacos, vários estudos vêm sendo realizados com o propósito de encontrar métodos eficientes e seguros que aumentem a penetração das substâncias através da pele (MAYORGA, 2007).

O sucesso da liberação de fármacos através da pele está relacionado à adequada redução na propriedade de barreira do estrato córneo. A perturbação temporária e reversível da função de barreira da pele a fim de aumentar a permeação e a retenção de fármacos pode ser realizada por métodos químicos. Utilizam-se substâncias químicas denominadas SPEs que são capazes de alterar de modo reversível as características de barreira da pele a fim de promover a permeação e retenção de fármacos. As qualidades desejáveis dos SPEs em relação à pele são: modular a função de barreira da pele de modo reversível, não serem alergênicos, não serem irritantes, mostrarem compatibilidade com o fármaco e com os demais componentes da formulação e apresentarem custo baixo (GUTERRES, SÍLVIA S. *et al.*, 2007; IBRAHIM SA, 2009; SILVA, J. A. *et al.*, 2010).

De acordo com o proposto, potenciadores de permeação cutânea foram adicionados às formulações de forma a avaliar o seu efeito sobre as propriedades físico-químicas, estabilidade e liberação e permeação cutânea do T4OL.

Ao determinar o sistema com característica físico-química adequada (B1) adicionaram-se os SPEs (limoneno, propilenoglicol e ácido oléico) à formulação, os quais auxiliam a penetração do T4OL na pele. Os dados de tamanho, PDI, ζ e EE são apresentados na Tabela 6, observando-se uma variação de tamanho entre 221 e 260 nm, conforme cada tipo de promotor de adsorção utilizado. Obteve-se PDI abaixo de 0,2, indicando um sistema homogêneo. Os valores de ζ apresentaram valores acima de 44 mV para as amostras B2 e B3, os quais refletem a boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal e evitam a agregação em virtude da grande força repulsiva entre as partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Já para a amostra B4 a estabilidade das NPs diminuiu.

Em comparação com sistema sem SPEs (B1), observou-se que ocorreu um aumento no tamanho das NPs e melhor estabilidade em relação às amostras B2 e B3.

Com a incorporação destes compostos também ocorreu uma diminuição na EE. Este resultado pode ter como causa uma possível interação destes compostos com proteína, diminuindo a interação do T4OL com a matriz polimérica.

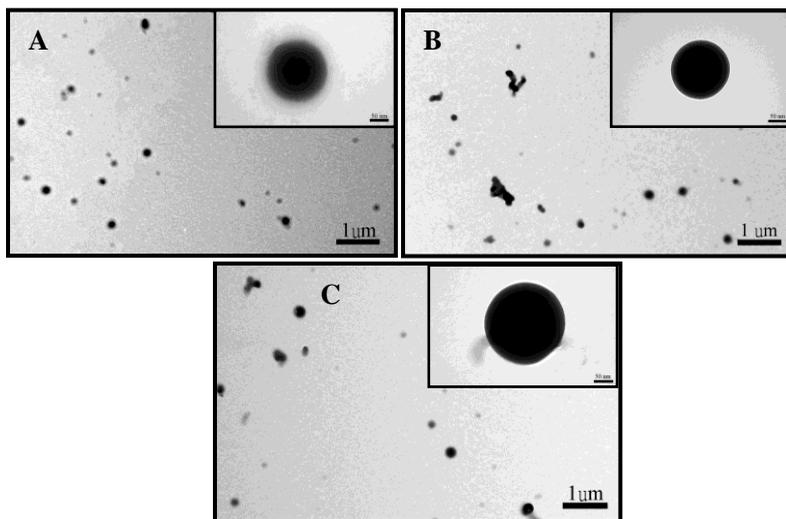
Tabela 6 - Influência dos diferentes promotores de permeação no tamanho, PDI, ζ e EE na formação das NPs de zeína.

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
B1	185,6±1,4	0,09±0,01	43,4±0,6	93,5±0,2
B2	221,4±1,6	0,11±0,01	48,6±1,4	80,4±1,2
B3	226,5±1,5	0,15±0,01	44,3±1,7	86,8±1,9
B4	260,5±1,7	0,20±0,01	27,1±1,3	74,8±2,6

As micrografias das NPs de zeína com encapsulação do T4OL na presença dos SPEs são apresentadas na Figura 24. As micrografias revelaram NPs compactas esféricas, com diâmetro médio de 180 nm (B2 e B3) e 207 nm (B4), respectivamente. Foi possível observar uma camada adsorvida sobre a superfície das NPs para amostra B2, sendo que a adsorção não ocorre de maneira uniforme.

As suspensões também apresentaram um tamanho médio de partícula menor que a obtida por estudos de DLS.

Figura 24- Micrografias obtidas por TEM das amostras B2 (A) B3 (B) e B4 (C) em maior e menor magnificação.



3.2.5 Estudo da estabilidade cinética das suspensões

Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das NPs no meio, resultando na formação de precipitados. Além disso, podem ocorrer problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas presentes na formulação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das NPs e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disso, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos coloides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância.

O tamanho de partícula, o ζ , a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas. Poucos estudos referentes à estabilidade de NPs contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e outros, relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2003).

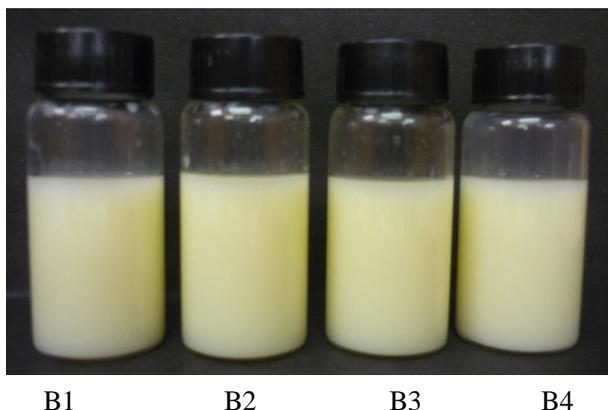
Testes preliminares de estabilidade podem ser realizados para se ter uma noção de quais formulações poderiam efetivamente ser posteriormente otimizadas para os testes finais de estabilidade.

Para avaliar a estabilidade das suspensões de NPs de zeína contendo T4OL na presença ou ausência de SPEs, após a caracterização dos sistemas foi avaliado o período de utilização destas formulações (período de tempo durante o qual uma preparação reconstituída ou uma forma farmacêutica acabada em recipientes multidose abertos pode ser usada) (ANVISA, 2003).

As amostras, em triplicata, de cada formulação, foram avaliadas considerando os seguintes parâmetros: tamanho das partículas, pH, PDI e ζ . Também foram avaliadas as características organolépticas das amostras (cor, odor, precipitações e separação de fases) e o teor do princípio ativo.

Quanto aos aspectos macroscópicos, as suspensões apresentaram-se homogêneas e de coloração branca leitosa (Figura 25). Durante o período de teste de 30 dias, houve alterações no aspecto físico macroscópico de algumas amostras, quanto à precipitação. A amostra B4 precipitou após 20 dias de armazenamento à temperatura ambiente enquanto que amostra B1 precipitou após 30 dias de armazenamento. Já as amostras B2 e B3 não apresentaram precipitação.

Figura 25 - NPs de zeína com T4OL encapsulado na ausência (B1) e na presença dos SPEs, propilenoglicol (B2), limoneno (B3) e ácido oleico (B4).



Na Figura 26 são apresentados tamanhos médios e ζ das quatro formulações estudadas durante 30 dias de armazenamento a 25 °C. Observa-se que as formulações B1, B2 e B3 mantiveram os valores de tamanho e ζ estáveis até aproximadamente 20 dias de armazenamento. Já o sistema B4 foi estável apenas 5 dias. Após este período fica nítida a queda do ζ próximo a valores que levam à instabilidade do sistema (valores de ζ inferiores a + 30 mV) (Figura 26 B) e conseqüentemente ocorre uma provável aglomeração das partículas com aumento do tamanho. Quanto aos valores da PDI (Figura 27), os mesmos aumentam após 30 dias de armazenamento, como consequência da instabilidade do sistema, provavelmente em função da agregação e/ou sedimentação das partículas do sistema. Em módulo, um valor de ζ relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de NPs adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 26 - Tamanho e ζ das suspensões (■) B1, (●) B2, (▲) B3 e (▼) B4 em relação ao tempo (dias). As suspensões foram mantidas em recipientes de cor transparente a uma temperatura de 25 °C.

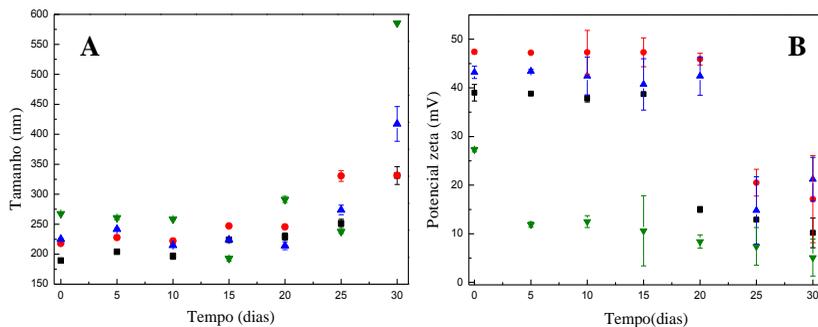
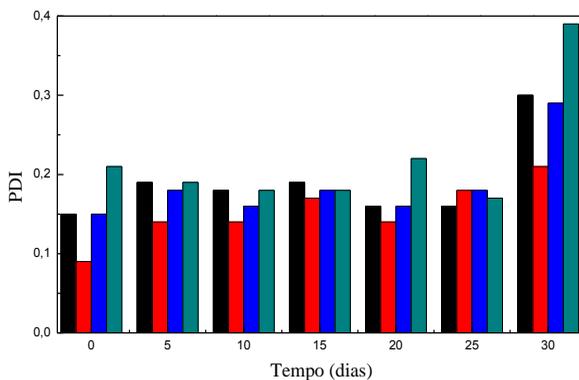


Figura 27 - PDI em função do tempo (dias) das amostras B1 (■), B2 (■); B3(■) e B4 (■).



Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões das NPs podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indicio de degradação do polímero ou de algum outro componente da suspensão, ou pode até mesmo indicar um processo de difusão da substância ativa, do interior da NP para o meio aquoso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

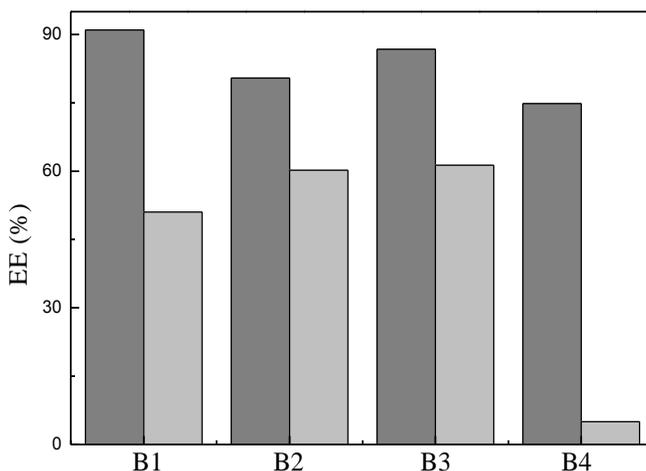
A Tabela 7 expressa os valores referentes ao pH inicial das formulações bem como durante o armazenamento em temperatura ambiente. Pode-se observar que durante o período estudado, os valores de

pH de todas as formulações estudadas mantiveram-se constantes, não sofrendo mudanças. Pode-se observar que apenas o sistema B4 apresentou pH diferente em relação aos outros sistemas devido a presença do ácido oleico.

Tabela 7 - Determinação do pH durante os 30 dias de experimento.

Tempo (dias)	pH			
	B1	B2	B3	B4
0	3,73	3,73	3,76	3,49
5	3,73	3,74	3,80	3,54
10	3,73	3,74	3,70	3,56
15	3,62	3,70	3,68	3,50
20	3,71	3,71	3,80	3,53
25	3,84	3,71	3,77	3,55
30	3,76	3,71	3,71	3,53

Os valores encontrados para EE no tempo zero e após 30 dias de armazenamento são apresentados na Figura 28. Nota-se que após 30 dias de armazenamento ocorreu difusão do princípio ativo das partículas para o meio, fato que pode ter contribuído para a aglomeração das partículas e consequente alteração dos valores de ζ e PDI. A formulação contendo T4OL na presença do ácido oleico como SPE (B4) foi a que ocorreu mais perda do composto ativo para o meio exterior. Tal fato pode estar relacionado com o tamanho da molécula do sistema B4, o qual pode ter aumentado a distância entre as moléculas de proteína, facilitando a difusão do T4OL através da matriz polimérica. Também foi realizado o cálculo da perda total de teor (inicial – final dos 30 dias), obtendo uma perda de 40% para a amostra B1, 20,2% para B2, 25,5% para B3 e 69,8% para B4. Estes resultados demonstraram que os sistemas contendo propilenoglicol e limoneno foram os mais efetivos no requisito de retenção do princípio ativo no interior da NP.

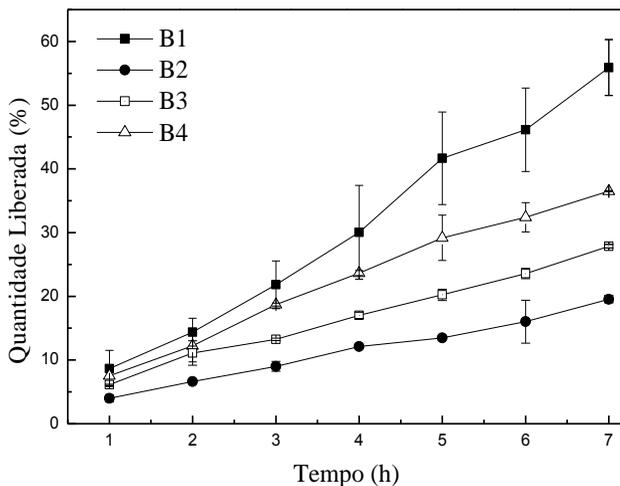
Figura 28 - EE no tempo zero (■) e 20 dias (□).

3.2.6 Liberação *in vitro*

Os estudos de liberação são ferramentas úteis nas fases iniciais do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, uma vez que é capaz de indicar se a liberação do fármaco é controlada/sustentada ou imediata. No desenvolvimento de sistemas de entrega de fármaco, o comportamento de liberação é um fator-chave para se verificar sua potencial aplicabilidade (SOUSA *et al.*, 2012).

Na NP com o T4OL encapsulado (B1) ocorreu a liberação de 55,9% do fármaco em 7 h (Figura 29). Nas amostras com os promotores de permeação a liberação foi mais lenta. A amostra com a presença do ácido oleico (B4) apresentou valor de liberação mais elevado em comparação com a que contém limoneno (B3) (36,5% versus 27,9% no período de 7 h). Já as NPs contendo propilenoglicol mostraram o valor de liberação menor para as formulações testadas (19,6% em 7 h). Estes resultados mostram a consistência adequada dos sistemas para administração tópica prolongada do fármaco.

Figura 29 - Perfil de liberação do T4OL na presença e ausência dos promotores de permeação em membrana de acetato de celulose.



Os dados obtidos a partir de estudos *in vitro* de liberação foram ajustados em várias equações cinéticas para determinar o mecanismo de liberação do T4OL. O critério para a escolha do modelo mais adequado foi baseada na análise de regressão linear ($> R^2$). As constantes obtidas e valores de R^2 correspondentes são apresentados na Tabela 8. A equação cinética de ordem zero foi o modelo que melhor explicou o comportamento da liberação do T4OL a partir das diferentes formulações, uma vez que os valores mais elevados de R^2 foram obtidos neste caso. De acordo com este modelo, a liberação do fármaco ocorreu a uma velocidade constante e é independente da concentração de T4OL. Esta taxa constante é altamente desejável em relação à liberação do fármaco, porque a mesma quantidade de fármaco é liberada por unidade de tempo sob esta condição.

A Tabela 8 também mostra os resultados para o ajuste dos dados usando o modelo de Korsmeyer-Peppas. Este modelo é geralmente aplicado na análise de dados de liberação dos sistemas poliméricos, nos casos em que o mecanismo de liberação não é bem compreendido ou se mais do que um tipo de fenômeno de liberação do fármaco ocorre (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). O ajuste da Equação 3 com os dados experimentais e os valores n obtidos permitiram observar que ocorreram duas situações diferentes, na ausência e na presença de SPES. O modelo de Korsmeyer-

Peppas usa o valor de n , a fim de caracterizar diferentes mecanismo de liberação (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; MATHEW, 2007; NA., 1985). O valor de $n = 0,5$ caracteriza a liberação através da difusão de Fick e a situação na qual $0,5 < n < 1$, segue um modelo não Fickiano denominado por transporte anômalo. A liberação de ordem zero ou transporte caso II ocorre se o valor de n é 1. Para os valores de n maiores que 1, o mecanismo da liberação do fármaco é considerado como super transporte caso II. O valor obtido de n para sistema B1 foi aproximadamente 1,0 (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; MELLO; RICCI-JÚNIOR, 2011). É importante observar que os valores de K obtidos utilizando-se os modelos de ordem zero e de Korsmeyer-Peppas são muito próximos, de 8,04 e 7,96 h^{-1} , respectivamente. Assim, o modelo de Korsmeyer-Peppas sugere que a liberação do T4OL segue uma cinética de ordem zero.

Com a adição de SPEs ao sistema (B2-B4), os valores n mudaram drasticamente, de 0,75-0,83. Estes resultados sugerem que a adição de SPEs muda a transferência de massa a partir de ordem zero para um modelo de transporte não Fickiano anômalo, o que envolve o comportamento misto entre difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

Tabela 8 - Coeficiente de correlação (R^2) dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

Amostras	Ordem zero		Primeira ordem		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	K (h^{-1})	R^2	K (h^{-1})	R^2	K ($h^{-1/2}$)	R^2	K (h^{-n})	n	R^2
B1	8,0	0,989	0,14	0,962	0,45	0,977	7,96	0,98	0,987
B2	2,5	0,995	0,11	0,943	0,22	0,977	3,88	0,80	0,994
B3	3,5	0,996	0,10	0,942	0,16	0,979	6,16	0,75	0,991
B4	4,9	0,991	0,11	0,925	0,11	0,992	7,34	0,83	0,995

A solubilidade de T4OL nos sistemas contendo promotores de permeação ocorreu na seguinte ordem: B2 > B3 > B4, enquanto que a ordem de liberação do T4OL nas NPs foi: B1 > B4 > B3 > B2 (Figura 30). A ordem de liberação observada de T4OL ($\log P = 2,99$) (CARSON. C., 2006), na presença dos promotores de permeação, reflete a lipofilicidade desses últimos: ácido oleico ($\log P = 6,5$) (DEL RIO-SANCHO *et al.*, 2012) > R-(+)-limoneno ($\log P = 4,23$) (DEL RIO-SANCHO *et al.*, 2012)

>propilenoglicol ($\log P = -0,78$) (DURACHER *et al.*, 2009). Quando um composto com uma elevada lipofilicidade, tal como o ácido oleico, é adicionado ao sistema, de preferência pode interagir com a zeína, em vez do T4OL e a liberação de T4OL é, portanto, mais rápida. Por outro lado, o *R*-(+)-limoneno tem uma lipofilicidade mais baixa e sua interação com a zeína tende a ser mais fraca, o que aumenta a interação do T4OL com a zeína. Com a utilização de propilenoglicol (um composto hidrofílico), NPs revestidas são formadas devido à interação deste composto com a superfície das NPs através de ligação de hidrogênio e este revestimento hidrofílico sobre a superfície das NPs tem um efeito retardador da liberação do T4OL.

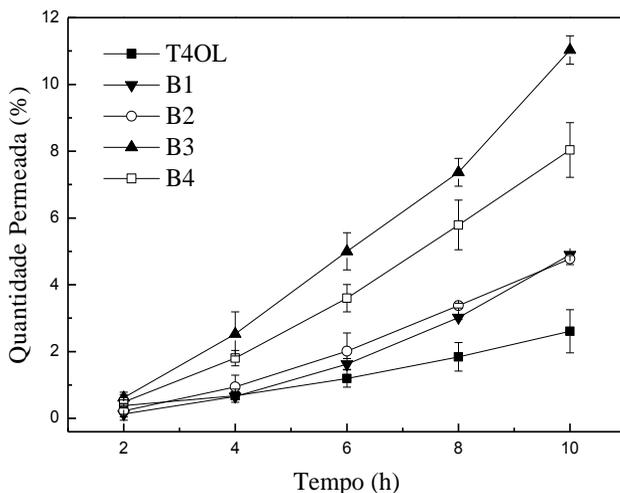
3.2.7 Permeação e retenção cutânea

Com o objetivo de verificar a capacidade das diferentes NPs de zeína em permear o T4OL na pele, antes e após a adição dos SPEs, estudos de permeação *in vitro* foram conduzidos usando células de difusão tipo Franz e peles de orelhas suínas como modelo de membrana por um período de 10 horas.

Os perfis de permeação de T4OL através da pele de orelha suína após a aplicação dos diferentes nanocarreadores a base de zeína são mostrados na Figura 30. Os resultados obtidos foram expressos em quantidades cumulativas de T4OL permeado (%) em função do tempo (h).

Observou-se um aumento constante na quantidade de fármaco permeado com o tempo para todos os sistemas e maior permeação de todos os sistemas nanoparticulados em comparação ao controle. Os resultados apontam que dentre as formulações com SPEs a amostra com limoneno (B3) apresentou maior permeação seguida pela amostra com ácido oleico (B4). Já com propilenoglicol (B2) não apresentou diferença em relação à amostra sem SPEs (B1).

Figura 30- Perfis de permeação do T4OL através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações (média \pm SD, n = 3).



O tempo de latência e o coeficiente de permeabilidade foram estimados após a plotagem gráfica da quantidade permeada [% *versus* tempo (h)], conforme a Tabela 9.

O coeficiente de permeabilidade aumentou na seguinte ordem: B3 > B4 > B2 = B1 > T4OL, sendo que a quantidade permeada através da pele aumentou após a aplicação dos promotores de permeação. Quando os coeficientes de permeabilidade das diferentes formulações de T4OL foram comparados entre si, as suspensões de NPs apresentaram valores superiores à solução de T4OL (controle) (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). Os sistemas B1 e B2 não foram significativamente diferentes entre si. Já o sistema B3 foi o mais eficaz dentre os três SPEs testados, tendo aumentado os valores de permeação em duas vezes. O sistema B4 também foi eficiente, porém não tanto quanto como limoneno.

Já em relação ao tempo de latência apenas a amostra B2 apresentou menor valor comparado com o controle. A amostra B1 foi a que apresentou maior valor do tempo de latência e os sistemas B3 e B4 apresentaram valores intermediários e não foram significativamente diferentes entre si.

Desta forma, o sistema B3 apresentou o maior valor do coeficiente de permeação ($0,0072 \text{ cm s}^{-1}$), porém um alto tempo de latência (1,8 h). Esses dados indicam que o sistema foi capaz de romper a barreira imposta

pelo estrato córneo. No entanto, o tempo necessário para isso ocorrer foi demasiadamente longo.

Tabela 9- Parâmetros de permeação dos diferentes sistemas com T4OL (n = 3).

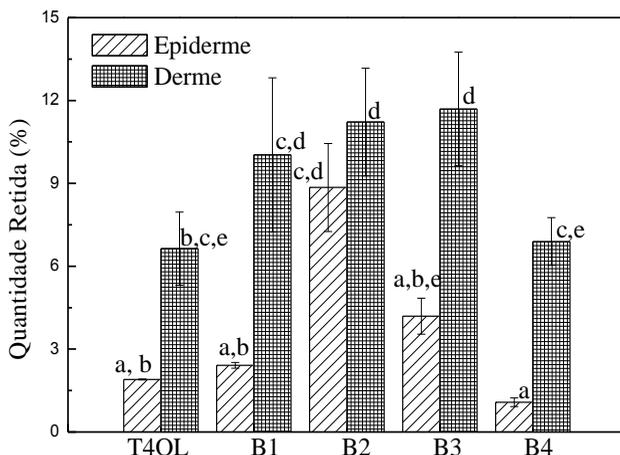
Amostra	Tempo de latência (h)	Coefficiente de Permeabilidade (cm h⁻¹)
T4OL	1,51±1,31 ^c	(1,6±0,5)×10 ⁻³ ^b
B1	2,53±0,06 ^d	(3,4±0,1)×10 ⁻³ ^a
B2	1,36±0,51 ^b	(3,6±0,3) ×10 ⁻³ ^a
B3	1,85±0,38 ^a	(0,7±0,4) ×10 ⁻³ ^d
B4	1,87±0,04 ^a	(0,5±0,6) ×10 ⁻³ ^c

Letras iguais na mesma coluna significam que não existem diferenças significativas entre as amostras (p < 0,05).

A porcentagem de T4OL retida na derme e na epiderme também foi avaliada para todos os sistemas (Figura 31), sendo que foi obtida maior retenção do T4OL na derme do que na epiderme.

Em relação à quantidade de fármaco retida na epiderme, apenas o sistema B3 foi significativamente diferente em relação à solução de T4OL (controle) (ANOVA/SNK, p > 0,05). Em relação a derme os sistemas B2 e B3 foram significativamente diferentes da solução de T4OL (controle) (ANOVA/Tukey, p < 0,05), sendo que esses sistemas contêm promotor de permeação. Para o sistema B4, em que foi utilizado o ácido oleico como SPE, a quantidade de fármaco retido na pele demonstrou ser significativamente reduzida, apresentando menor retenção de T4OL na epiderme em relação ao controle e mesma quantidade na derme.

Figura 31 - Porcentagem de T4OL retida na derme e na epiderme após 10 horas. Média \pm SD ($n = 3$). Utilizaram-se os testes ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).



A permeação e a retenção do T4OL foram significativamente afetadas pelo tipo de nanocarreador proteico, sendo que sistemas com tamanho e ζ parecidos apresentaram comportamento semelhante, como foi o caso dos sistemas B1, B2 e B3. Já para o sistema B4 ocorreu um aumento no tamanho de aproximadamente 40 nm em comparação com outros sistemas e também apresentando ζ de 27 mV, resultando numa menor estabilidade e menor interação com camada externa (matriz lipídica) da pele.

Um maior percentual de recuperação, monitorado pelo balanço de massa, foi encontrado para as nanopartículas sem os promotores de permeação (B1). Para as preparações a partir de B2 foi possível recuperar 95% da quantidade de fármaco inicialmente adicionada. Menor percentual de recuperação foi encontrado para os sistemas B3 e B4 com valores de 89 e 96 %, respectivamente.

3.3 NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO DO TERPINEN-4-OL

As NPs foram preparadas pelo método de dessolvatação e as condições experimentais foram determinadas conforme descrito no item 3.1. Posteriormente, testou-se a encapsulação do T4OL utilizando a concentração de zeína e do surfactante como determinado no item 3.1, no entanto, com as condições determinadas ocorreu a precipitação. Desta forma, foi necessário corrigir a concentração do surfactante e da proteína, mantendo as mesmas condições experimentais previamente determinadas. Testes preliminares foram realizados para se obter NPs com diâmetro médio adequado e baixo PDI. Estas características foram acompanhadas por medidas de DLS e TEM, que fornecem informações relevantes, como distribuição de tamanho das partículas em suspensão, presença de agregados, PDI e características morfológicas.

3.3.1 Caracterização Físico-Química das NPs

Para estudar o efeito do estabilizante (F68) em relação às diferentes concentrações de zeína, mantendo fixa a proporção 1:1 de T4OL/zeína em pH5,6, foram preparadas NPs de zeína carregadas com T4OL (Tabela 10). As diferentes concentrações de F68 testadas mostraram que abaixo de 0,3% e acima de 1,0% (fase aquosa) formaram-se agregados (dados não mostrados). Já em relação à concentração de zeína, acima de 20 mg mL⁻¹ não foi possível obter NPs estáveis.

A utilização de uma concentração de F68 de 0,5% (fase aquosa), com aumento na concentração de zeína, resultou em NPs com tamanho e PDI maiores. O mesmo foi observado quando se utilizou a concentração de 0,8% de F68. Já em relação ao ζ (faixa de 25,1 - 26,9 mV) não houve nenhum efeito significativo em todas as concentrações estudadas.

Podaralla e Perumal (2012) também estudaram a influência de diferentes parâmetros sobre a preparação de NPs de zeína encapsulando o composto hidrofóbico 6,7-dihidroxicoumarina (DHC) como modelo. Eles obtiveram aumento no tamanho das NPs com o aumento na concentração de zeína de 0,09% a 0,5% (m/v), enquanto que na PDI não houve nenhum efeito significativo. Quando se utilizou baixa concentração [0,05 a 0,45% (m/v)] de lecitina ou F68, formaram-se agregados (PODARALLA; PERUMAL, 2012).

As NPs de zeína obtidas a partir de soluções com massa de 0,1-5 g foram analisadas por DLS. Os dados mostraram um aumento contínuo do tamanho das partículas, com o aumento da concentração de zeína.

Observou-se que em concentração acima de 2 g de zeína a solução estoque não foi dispersa de forma eficaz, porque grandes aglomerados de zeína foram visivelmente formados após homogeneização. A dependência do diâmetro da partícula sobre a concentração de zeína pode ser explicada pela dispersão e processos de precipitação. Quando a concentração de zeína é aumentada, um aumento na viscosidade da dispersão afeta o processo que conduz à nucleação, resultando em partículas maiores (ZHONG; JIN, 2009).

Tabela 10 - Efeito da concentração de zeína em relação aos tamanhos das NPs de zeína carregadas com T4OL.

Zeína (mg mL ⁻¹)	F68 (% fase aquosa)	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)
5	0,5	169,5	0,15	26,9
5	0,8	182,3	0,19	25,7
10	0,5	195,4	0,16	25,6
10	0,8	209,1	0,20	25,9
20	0,5	210,8	0,19	25,1
20	0,8	230,3	0,23	25,3

A fim de avaliar o tamanho, PDI e ζ das NPs em função do pH do meio, foi realizado um estudo na faixa de pH entre 3 e 9. A Figura 32 mostra a variação do tamanho, PDI e ζ, respectivamente. As NPs de zeína apresentaram tamanho variando entre 165 a 210 nm e o PDI no intervalo de 0,16 a 0,28, sendo que no PI ocorreu um grande aumento no tamanho das NPs de aproximadamente 800 nm e a presença de uma segunda população de partículas, com cerca de 2 μm de diâmetro (não mostrado). Ocorreu também um aumento no PDI, de 0,2 para 0,4. Foi observada a presença de grumos nas paredes do frasco, assim como a formação de precipitados. Um pequeno precipitado também foi observado em pH 3. O menor tamanho e PDI foram obtidos próximo ao PI, em pH 5,4, com ζ positivo e em pH 6,5, com ζ negativo.

Observa-se que em valores de pH acima de 8 ocorre um aumento no valor do tamanho e PDI (Figura 32). Segundo Zhong e Jin (2009) a zeína é altamente solúvel em soluções alcalinas e devido ao aumento do pH pode ocorrer um aumento nas interações entre as NPs de zeína e água, o que pode aumentar o diâmetro das NPs na dispersão. Por outro lado, considerando que o número de partícula é idêntico em diferentes valores de pH, um

diâmetro maior em pH alto resulta numa fração de partícula de maior volume e, portanto, uma viscosidade mais elevada (ZHONG; JIN, 2009).

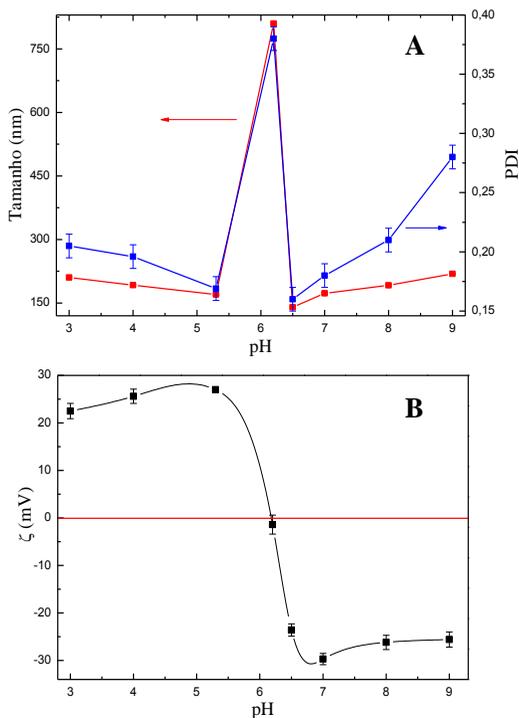
A zeína apresentou uma tendência à formação de agregados maiores quando foi carregada positivamente em $\text{pH} < \text{PI}$. Assim, o tamanho das NPs de zeína diminuiu à medida que o pH é aumentado. A maior solubilidade da zeína em $\text{pH} \geq 8$ afeta a taxa de precipitação, resultando em NPs relativamente maiores a $\text{pH} \geq 8$. Isto também pode explicar a grande variação no ζ em pH 8 (CABRA, V. 2006).

Podaralla e Perumal (2012) também estudaram a influência do pH do meio em relação ao tamanho e PDI das NPs de zeína carregadas com DHC. Os valores foram elevados em pH extremos (pH 2 e 12), o tamanho das NPs e PDI foram $> 300 \text{ nm}$ e $\geq 0,4$, respectivamente. NPs menores ($143 \pm 7 \text{ nm}$) e com um baixo PDI ($0,26 \pm 0,01$) foram formadas em pH 7,4, próximo ao PI. Além disso, estudou-se o efeito do pH sobre agregação das partículas, ocorrendo uma alta variação do ζ em pH alcalino (pH 8) (PODARALLA; PERUMAL, 2012).

NPs preparadas usando legumina, uma proteína vegetal insolúvel em água, também mostraram efeitos similares de pH sobre o tamanho das NPs (IRACHE *et al.*, 1995). No entanto, para as NPs de albumina, em pH próximo do PI ($\sim 5,05$), partículas maiores foram produzidas (LANGER *et al.*, 2003). Ao contrário da zeína e da legumina, a albumina é uma proteína solúvel em água. As mudanças estruturais em diferentes valores de pH são influenciadas pelos aminoácidos e pela sua carga proteica.

Na Figura 32 B observa-se que no pH 6,2 atingiu-se o PI da suspensão, no qual a neutralidade das cargas foi obtida. Na faixa de pH entre 3 e 6 ocorreram pequenas alterações no ζ . Já no pH entre 6,5 e 9 a maior estabilidade é obtida em pH 7 com valor do ζ de $-29,7 \text{ mV}$.

Figura 32 - Variação do tamanho, PDI (A) e ζ (B) em função do pH das NPs de zeína(5 mg mL⁻¹) carregadas com T4OL.



A partir dos resultados obtidos, foram realizados estudos das suspensões em valores de pH 5,6 e pH 6,5 para encapsulação do T4OL. Com a concentração de zeína de 5 mg mL⁻¹, F68 de 0,5% (m/v) (% fase aquosa) e T4OL de 100% (% m/m zeína). Uma formulação sem o princípio ativo também foi desenvolvida com o objetivo de comparar o comportamento do sistema nanoparticulado. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 11. Todas as suspensões apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo com coloração turvo/esbranquiçada, sem precipitações.

Os sistemas apresentaram valores de pH 5,51-6,46 e diâmetros de partícula de 140,3-192,4 nm. Os valores do PDI foram inferiores a 0,17, indicando uma estreita distribuição de tamanho das partículas e, conseqüentemente, uma boa homogeneidade destes sistemas.

De certa forma, quando se trabalha com partículas em escala nanométrica para aplicação tópica, independentemente da metodologia utilizada para a produção, o ideal é que todas as formulações se apresentem com diâmetro médio de partícula menor que 600 nm e monodispersas.

As suspensões estudadas apresentaram pH levemente ácido, as quais encontram-se coerentes para este tipo de sistema nas faixas recomendáveis para utilização em formulações tópicas (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Os valores de pH obtidos, após a preparação, a partir das suspensões de zeína na ausência e presença do T4OL não diferiram significativamente entre si, apresentando-se entre $5,62 \pm 0,01$ e $5,51 \pm 0,01$ e $6,53 \pm 0,02$ e $6,46 \pm 0,08$. A presença do T4OL não afetou o pH das suspensões.

Já em relação ao tamanho, ocorreu uma diminuição de 192 nm para 166 nm com aumento do pH de 5,6 para 6,5 nos sistemas nanoparticulados de zeína. O mesmo foi observado quando se realizou a encapsulação do T4OL nos dois sistemas: o tamanho diminuiu de 192 para 170 nm em pH 5,6 e 166 nm para 140 nm em pH 6,5. As NPs de zeína em pH 6,5 apresentam ζ negativo, sendo obtido da desprotonação dos grupos carboxilas dos aminoácidos da proteína. A zeína apresenta menor número de agregações com aumento do pH e assim, o tamanho das NPs de zeína diminui à medida que o pH é aumentado. Desta forma, a proteína com carga negativa na presença do F68 é mais estável, devido a uma maior interação entre ambos.

Tabela 11 - Valores referentes à caracterização físico-química das suspensões contendo nanoesfera de zeína na presença e ausência do T4OL.

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)	pH
A1	192,4 \pm 1,8	0,15 \pm 0,01	24,2 \pm 1,5	5,62 \pm 0,01
A2	166,4 \pm 2,0	0,16 \pm 0,01	-18,9 \pm 1,8	6,5 \pm 0,01
A3	170,2 \pm 2,1	0,17 \pm 0,01	27,2 \pm 1,3	5,51 \pm 0,01
A4	140,3 \pm 1,6	0,16 \pm 0,01	-23,6 \pm 1,6	6,46 \pm 0,02
A5	196,2 \pm 2,0	0,15 \pm 0,01	49,4 \pm 1,2	3,88 \pm 0,01

Valores referentes à média para determinação de três formulações \pm desvio padrão.

Já com a encapsulação do T4OL, ligações de hidrogênio podem formar-se entre o grupo amida do resíduo de aminoácido glutamina da zeína

e o grupo hidroxila do T4OL, sendo que, devido à forte interação por meio de ligações de hidrogênio entre a proteína e o princípio ativo, provavelmente forma-se um complexo que pode diminuir a liberação do mesmo. Além disso, tanto o T4OL quanto a zeína são hidrofóbicos, portanto o efeito hidrofóbico está envolvido na formação de NPs zeína/T4OL.

Esses resultados também foram obtidos por Hurtado-López e Murdan (2005) quando prepararam microesferas de zeína vazia e carregadas com ovalbumina com objetivo de verificar seu potencial como sistema de entrega de fármaco/vacina. A ovalbumina foi usada como um modelo de antígeno. O tamanho das microesferas mostrou-se diferente para as partículas vazias e carregadas com ovalbumina, o diâmetro médio das microesferas de zeína vazias e carregadas com ovalbumina foram 1.356 nm e 607,47 nm, e PDI 0,662 e 0,386, respectivamente, apresentando uma diminuição no tamanho das partículas com encapsulação da ovalbumina (HURTADO-LÓPEZ, P. 2005).

Luo *et al.* realizaram a encapsulação do α -tocoferol (TOC) em NPs de zeína revestidas com CS. As análises físico-químicas sugerem que as interações eletrostáticas por ligação de hidrogênio, além do efeito hidrofóbico, são as principais forças na formação do complexo TOC/zeína-CS. As ligações de hidrogênio podem ser formadas entre os grupos amida da glutamina da zeína e os grupos hidroxilas do TOC. Além disso, tanto TOC como a zeína são compostos hidrofóbicos, então um efeito hidrofóbico também pode estar ocorrendo durante a formação das NPs TOC/zeína (LUO *et al.*, 2011b).

Em relação ao ζ , quando foi realizada encapsulação do T4OL ocorreu um pequeno aumento de 24,2 para 27,2 mV em pH 5,6 e de -18,9 para -23,6 mV em pH 6,5. Os resultados sugerem que as NPs de zeína apresentam uma boa estabilidade.

3.3.2 NPs de zeína revestidas com quitosana

As suspensões de NPs carregadas com T4OL foram obtidas pelo método de dessolvatação. Em seguida, foram revestidas com CS utilizando gotejamento de uma solução do polissacarídeo sobre a suspensão das NPs, com diferentes concentrações de CS. Estas dispersões foram analisadas através de medidas de tamanho, PDI e ζ . Os resultados demonstraram que tanto o tamanho e o PDI das partículas quanto a carga superficial sofreram alterações significativas em função da razão da concentração de CS adicionada pela concentração de zeína, a pH 6,5 (Figura 33 e 34).

As NPs preparadas sem CS apresentaram uma carga de superfície negativa de -22 mV devido à desprotonação dos grupos amino tornando-se positiva com a adição de CS. Para maiores concentrações de CS foi observado um platô, sugerindo um limite de adsorção das cadeias do polieletrólito, apresentando o valor de ζ máximo foi de 49 mV.

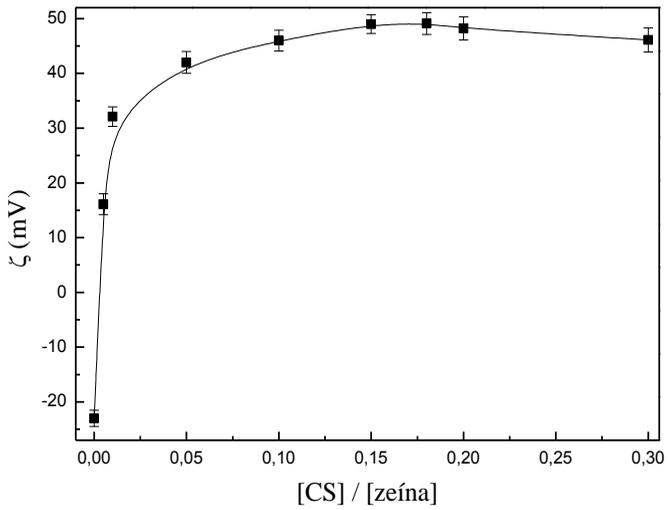
O aumento na carga superficial das NPs é atribuído ao aumento de grupos aminos carregados positivamente de moléculas de CS, provando que as NPs foram revestidas com sucesso. As interações, que são basicamente de origem eletrostática entre as NPs carregadas negativamente e o polissacarídeo de carga oposta, provocam uma alteração dinâmica do sistema, o qual foi observado por medidas de tamanho e ζ .

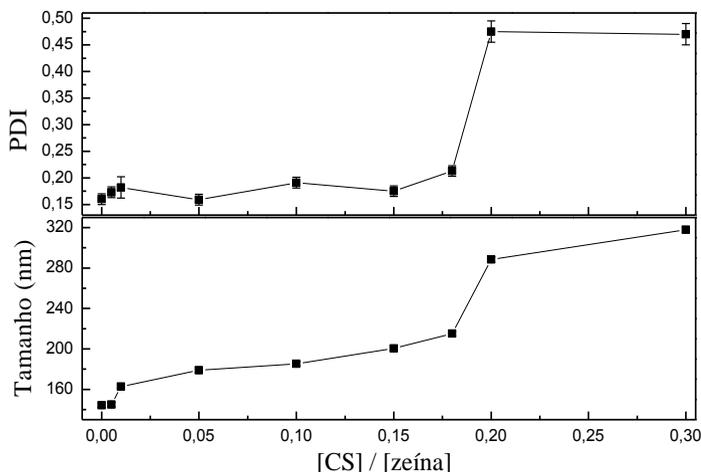
Estas interações também podem ocorrer devido às fortes ligações de hidrogênio entre os grupos amida do resíduo de glutamina da zeína e grupos hidroxilados do T4OL. Além disso, a CS tem ambos os grupos amino e hidroxil, assim, as ligações de hidrogênio podem ser facilmente formadas entre CS e T4OL, CS e zeína.

Um estudo realizado com NPs de zeína carregadas com TOC e revestidas com CS mostrou, através de análises físico-químicas e estruturais, que as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio foram as principais forças responsáveis pela formação do complexo (LUO *et al.*, 2011b).

Simultaneamente, foi investigada a variação do tamanho e PDI das NPs com aumento na concentração de CS (Figura 34). Quando a relação de CS/zeína aumentou de 0 para 0,15, o tamanho de NPs variou de 144 a 200 nm e a PDI de 0,16 a 0,19, sendo que a partir de 0,2 obtiveram-se tamanhos acima de 280 e PDI de 0,5.

Porém, Luo *et al.* (2011) observaram que o tamanho de NPs constituídas por zeína carregadas com TOC, sem revestimento com CS, era cerca de 800 nm. No entanto, o tamanho das NPs diminuiu cerca de 364 nm após revestimento com CS e o ζ foi aumentado para um valor altamente positivo. Porém, a partir de certo aumento na concentração de CS, ou na percentagem de TOC, o tamanho das partículas do complexo incrementou gradualmente para cerca de 800 nm, que pode ser causado pelo excesso de CS e concentração de TOC. O revestimento com CS não afeta a EE, mas melhorou muito o controle da liberação do TOC (LUO *et al.*, 2011a). Outros estudos também mostraram que a concentração de CS, bem como a massa molecular da CS, pode afetar significativamente o tamanho das partículas (GAN; WANG, 2007; HU, B. *et al.*, 2008). Entretanto, este efeito da diminuição no tamanho das partículas com a adição de CS não foi observado neste estudo e provavelmente outros parâmetros de formulação foram preponderantes na obtenção do diâmetro das nanopartículas.

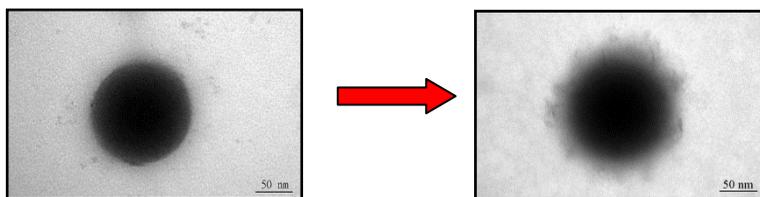
Figura 33 - Variação do ζ (mV) em função da razão [CS]/[zeína].**Figura 34** - Variação do PDI (A) e tamanho (B) em função da razão [CS]/[zeína].



Conseqüentemente, a relação máxima CS/zeína de 0,15 foi selecionada para a preparação de NPs revestidas com CS. As concentrações de 5 mg mL^{-1} de NPs de zeína carregadas com T4OL e razão de 0,15 [CS]/[zeína] (amostra A5) foram estudadas. O tamanho obtido foi de $196,2 \pm 2,0 \text{ nm}$, PDI de $0,15 \pm 0,01$ e ζ de $49,4 \pm 1,2 \text{ mV}$, como mostrado nas Figuras 33 e 34. O pH obtido foi igual a $3,88 \pm 0,01$, devido à preparação em solução de ácido acético.

As imagens de TEM das NPs de zeína, tanto na presença quanto na ausência de CS, apresentaram forma esférica, como mostrado na Figura 35.

Figura 35 – Imagens de TEM das NPs de zeína carregado com T4OL na ausência de CS (A) e na presença de CS (B).



3.3.3 Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)

Para complementar as técnicas utilizadas para determinar o tamanho, distribuição do tamanho e PDI das NPs, estudou-se também a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz das suspensões de NPs de zeína. Uma vez que as NPs em suspensão estão em constante movimento, as flutuações da intensidade da luz espalhada estão diretamente relacionadas ao movimento browniano. Portanto, a técnica de DLS foi utilizada para analisar este movimento e correlacioná-lo com as dimensões das NPs em suspensão aquosa, através de flutuações temporais na luz espalhada que geram informações a respeito da dinâmica das partículas em solução (GIORDANI *et al.*, 2006; SCHARTL, 2007).

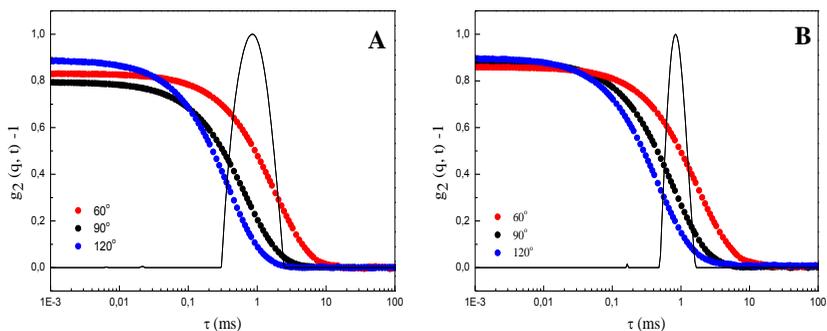
O espalhamento de luz representa uma técnica experimental importante no estudo das características estruturais de NPs em suspensão. As funções de correlação temporais obtidas a partir dos dados de DLS mostraram-se com um único tempo de relaxação representativo de uma população de estruturas de tamanhos relativamente próximos.

A Figura 36 mostra a função de autocorrelação medida nos ângulos de 60°, 90° e 120° de espalhamento e distribuição dos tempos de relaxação medidos no ângulo de 90°, para NPs de zeína (A1) e NPs de zeína carregadas com T4OL em pH 5,6 (A3). A distribuição de tempos de relaxação obtida para as amostras A1 e A3 resultou em um R_H de 110 nm e 88 nm, com PDI de 0,25 e 0,19 a 90°, respectivamente. A amostra A1 apresentou uma grande dependência angular no espalhamento da suspensão, sendo essa observação um indicativo de partículas grandes e/ou de um sistema polidisperso.

Os resultados corroboram com o valor obtido pelo tamanho médio encontrado quando se utilizou o Zetasizer, instrumento incapaz de ponderar a dependência angular e que faz medidas somente em um único ângulo fixo. Foram obtidos para as amostras A1 e A3 tamanho em diâmetro de 192 nm e 170 nm e PDI 0,15 e 0,16, respectivamente.

Os resultados obtidos por DLS também apontaram para uma diminuição no tamanho das NPs com a encapsulação do T4OL, podendo estar relacionado com interações do tipo ligação de hidrogênio e efeito hidrofóbico entre a zeína e T4OL, como explicado no item 3.3.1.

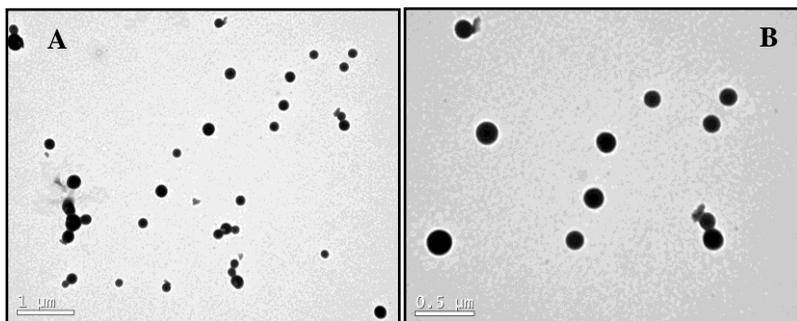
Figura 36 - Função de correlação $g_2(q, t) - 1$ em ângulos de espalhamento de 90° , 60° e 120° e a distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° (A) A1 e (B) A3.



Com o objetivo de confirmar o tamanho e verificar a morfologia das NPs de zeína, a análise pela técnica de TEM foi realizada e comparada com os dados obtidos por DLS. A micrografia de TEM da amostra A1 (Figura 37) apresentou forma esférica e tamanho médio das NPs de 182 nm, sendo que a análise de TEM fornece um menor valor comparado ao tamanho obtido utilizando a técnica de DLS (220 nm).

As diferenças observadas entre as duas técnicas estão relacionadas ao processo de desidratação, uma vez que para análises de TEM foi necessária a secagem do solvente e para o espalhamento de luz as medidas foram feitas em solução, medindo-se assim o tamanho aparente das NPs, considerando a sua camada de hidratação/solvatação.

Figura 37 - Micrografias para as NPs de zeína (A1) (A e B) em maior e menor magnificação.



Para os sistemas em investigação os valores de R_g foram determinados a partir de um gráfico de $\ln I$ versus q^2 , como ilustrado na Figura 38A, que apresenta o valor de R_g para amostra A3, cujo valor foi calculado com base na lei de Guinier, a partir do coeficiente angular da reta. Esta aproximação é bastante utilizada para a determinação de R_g de partículas, sendo válida apenas quando $qR_g < 1$. Já o R_H foi obtido através do gráfico de Γ versus q^2 calculado usando a relação de Stokes-Einstein.

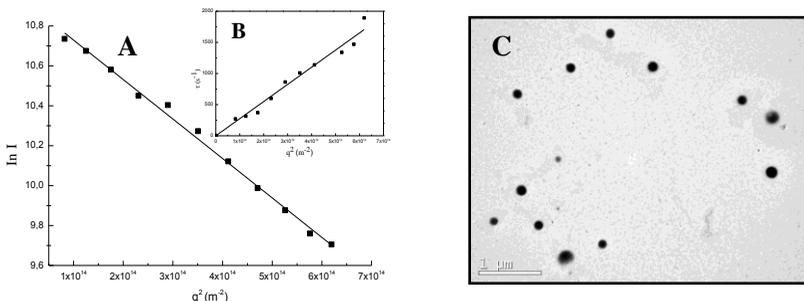
A Figura 38 apresenta dependência angular da intensidade de espalhamento de luz e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ), calculada usando a análise CONTIN, da suspensão de NPs de zeína com encapsulação do T4OL em pH = 5,6 (A3).

Na Figura 38A é possível observar a ausência de uma correlação linear perfeita em toda a faixa angular, sendo um indicativo de sistemas polidispersos em solução. O valor de R_g obtido foi de 77 nm. A Figura 38B mostra a variação típica da frequência angular Γ medida como uma função de q^2 indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas para uma solução e a existência de objetos esféricos. Portanto, o R_H pode ser corretamente calculado usando a relação de Stokes-Einstein. A distribuição de tempos de relaxação obtida para a amostra A3 resultou em um R_H de 88 nm, que reflete o raio aparente das NPs, considerando a sua camada de hidratação/solvatação.

Também foram realizadas as análises de SLS e DLS para todas as amostras, que apresentaram comportamentos semelhantes com a mesma morfologia e uma única distribuição de tamanho.

A Figura 38C apresenta o resultado obtido por TEM da amostra A3, com tamanho médio de 150 nm. O tamanho médio das NPs por DLS foi maior do que o tamanho médio obtido pelas análises de microscopias, como já mencionado anteriormente.

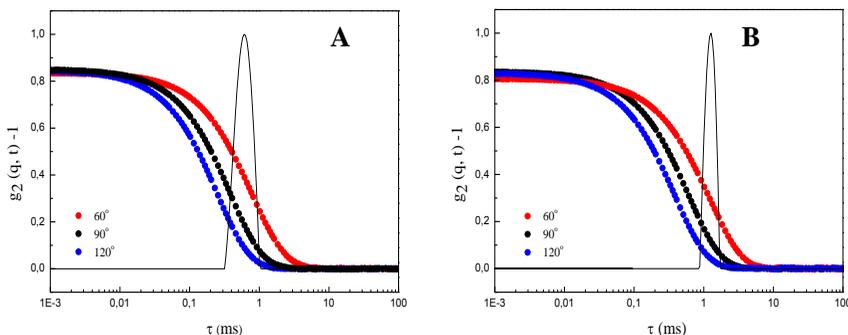
Figura 38 - Gráfico de Guinier para a dependência angular da intensidade de SLS (A); dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do DLS (B) e micrografia obtida por TEM (C). Obtidos para a amostra A3.



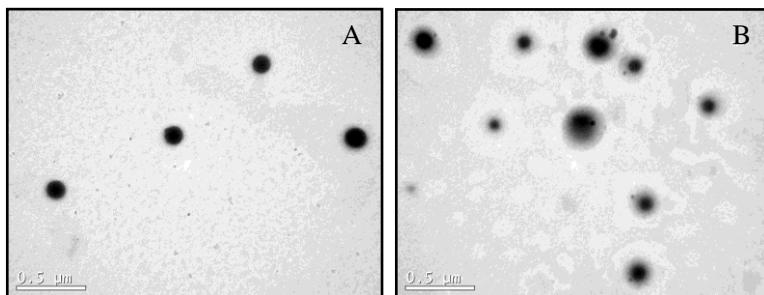
A Figura 39 mostra as funções de correlação obtidas nos ângulos de dispersão 60° , 90° e 120° e distribuições de tempo de decaimento, obtido em 90° , para as amostras A4 e A5. Para todos os ângulos estudados observa-se somente uma distribuição de tempos de relaxação bastante estreita. O R_H obtido das amostras A4 e A5 foram 74 nm e 102 nm, respectivamente.

O R_H aumentou com o revestimento de CS nas NPs, sugerindo a adsorção do polissacarídeo na superfície destas. Estes resultados indicam que a camada de revestimento de CS para amostra A5 aumentou sua espessura em cerca de 28 nm.

Figura 39 - Função de correlação $g_2(q, t) - 1$ em ângulos de espalhamento de 60° , 90° e 120° e a distribuição dos tempos de relaxação obtidos a 90° (A) A4 e (B) A5.



As micrografias das NPs de zeína com encapsulação do T4OL (A4) e revestidas com CS (A5) são apresentadas na Figura 40. As micrografias revelaram NPs compactas esféricas, com diâmetro médio de 140 nm (A4) e 180 nm (A5), respectivamente. Foi possível observar a camada de CS adsorvida sobre a superfície das NPs, e que a adsorção não ocorre de maneira uniforme. A espessura da camada de CS adsorvida na superfície da NP foi em média de 40 nm (Figura 40 B). As suspensões também apresentaram um tamanho médio de partícula menor que a obtida por estudos de DLS.

Figura 40 - Micrografias obtidas por TEM das amostras A4 (A) e A5(B).

Na Tabela 13 estão representados os resultados de R_g e R_H no qual a razão entre R_g , obtido do SLS da equação de Guinier, e seus respectivos valores de R_H , obtido do DLS da equação de Stokes-Einstein, leva à obtenção do grau de anisotropia (ρ), que pode ser utilizado para se estimar a morfologia das NPs, como representado pela Equação 3.

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad (3)$$

A Tabela 12 mostra os valores de ρ calculados teoricamente para as morfologias mais frequentemente encontradas.

Tabela 12 - Valores de ρ e a morfologia das partículas (GIACOMELLI, G. 2006).

Morfologia	ρ
Esfera idealmente homogênea	0,779
Vesícula	> 1,0
Polímero enovelado	> 1,5

A Tabela 13 apresenta os valores experimentais obtidos de cada amostra, mostrando variações de ρ de 0,8 a 0,89, o que, segundo Scharl (2007) é o valor esperado para nanoestruturas com geometrias esféricas homogêneas, corroborando com as morfologias observadas por TEM, como apresentado anteriormente.

Tabela 13 - Características dos sistemas determinados por DLS e SLS.

Amostras	R _g (nm)	R _H (nm)	ρ	PDI
A1	96	110	0,87	0,25
A3	77	88	0,87	0,19
A4	59	74	0,80	0,19
A5	91	102	0,89	0,2

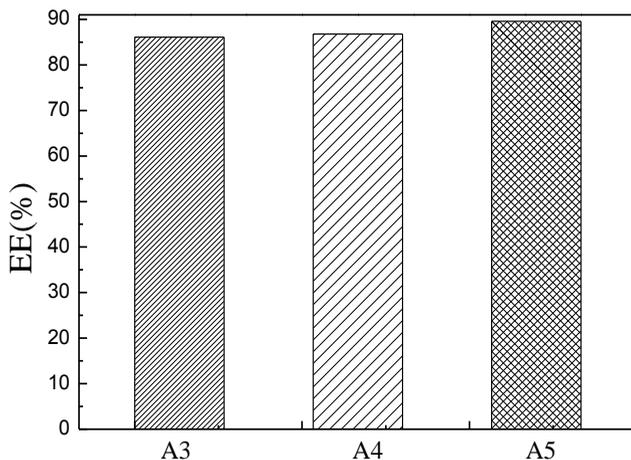
3.3.4 Determinação da EE do T4OL nas suspensões de NPs

Para a determinação da EE, as suspensões foram preparadas conforme metodologia descrita no item 2.2.3 e submetidas à análise por CLAE utilizando método validado descrito no item 2.2.5.

Como descrito no item 3.2, a curva de calibração do T4OL apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), não havendo desvio significativo de linearidade ($p > 0,05$), mostrando-se desta forma linear conforme validado por Nielsen and Nielsen (2006). A equação da reta, usada para ajustar os dados experimentais, apresentou $R > 0,999$.

Através dos resultados obtidos, pode-se demonstrar que a curva de calibração pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do teor de T4OL.

Na Figura 41 estão representados os resultados da EE (%), tendo sido obtido para a amostra A3 ($86,1 \pm 1,9\%$); A4 ($86,8 \pm 1,4\%$) e A5 ($89,6 \pm 1,8\%$). Para as suspensões preparadas em pH 5,6 (A3) e pH 6,5 (A4) não houve diferença significativa na EE. Para a amostra A5 revestida com CS ocorreu um pequeno aumento na EE.

Figura 41 - EE do T4OL em NPs de zeína.

Luo *et al.* (2011) relataram que não houve diferença significativa entre a EE de NPs TOC/zeína e complexo TOC/zeína-CS. Este resultado sugeriu que o revestimento com CS não afetou a EE de NPs TOC/zeína, talvez porque TOC tinha sido encapsulado em nanoesferas de zeína antes do revestimento com CS (LUO *et al.*, 2011b).

Em outro estudo, NPs de zeína foram utilizadas para o encapsulamento de DHC, nesse estudo, os autores obtiveram uma EE de 78%. O encapsulamento de DHC nas NPs de zeína foi evidente a partir da ausência do pico de fusão na curva de DSC. Uma vez que o ζ das NPs de zeína com DHC é apenas ligeiramente menor do que as NPs de zeína vazias, é mínima a adsorção de DHC na superfície e, conseqüentemente, a liberação brusca é esperada ser mínima. O tamanho das NPs de zeína não aumentou após o encapsulamento do DHC (PODARALLA; PERUMAL, 2012).

Existem outros estudos relatados na literatura sobre a preparação de NPs de zeína com outros surfactantes, tendo sido demonstrada uma EE acima de 78% (ASHOK P., 2010).

3.3.5 Estudo da estabilidade cinética das suspensões

A estabilidade é um parâmetro de validação muito pouco descrito em normas de validação de metodologia analítica (ISAAC, 2008), porém essencial para assegurar a qualidade e segurança de um produto. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), o estudo da estabilidade de produtos farmacêuticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito, desde sua fabricação até o término de sua validade (ANVISA, 2003). Ainda, o estudo da estabilidade compreende um conjunto de testes planejados para se obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir sua vida média e período de utilização em embalagem e condições de estocagem especificadas. A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2003).

Para avaliar a estabilidade das suspensões de NPs de zeína contendo T4OL, após a caracterização dos sistemas, algumas formulações, representando as famílias de experimentos realizados, foram escolhidas e avaliou-se o período de utilização destas formulações (período de tempo durante o qual uma preparação reconstituída ou uma forma farmacêutica acabada em recipientes multidose abertos pode ser usada) (ANVISA, 2003).

As amostras, em triplicata, de cada formulação, foram avaliadas considerando os seguintes parâmetros: diâmetro das partículas, pH, PDI e ζ . Também foram avaliadas as características organolépticas das amostras (cor, odor, precipitações e separação de fases) e o teor do princípio ativo.

Quanto aos aspectos macroscópicos, as suspensões apresentaram-se homogêneas e de coloração turvo-esbranquiçada. Durante o período de teste de 45 dias, houve alterações no aspecto físico macroscópico das amostras, quanto à precipitação. As amostras A4 precipitaram após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente enquanto que após 45 dias de armazenamento todas as amostras apresentaram precipitação.

O tamanho e o ζ das formulações foram medidos durante o período de teste, sendo apresentados na Figura 42 A-B e a PDI encontra-se na Figura 43. Como descrito anteriormente, a amostra A4 possui valor inicial de ζ negativo uma vez que o pH final da dispersão de NPs encontra-se

acima do PI da zeína (PI = 6,2). As amostras A3 e A5 possuem valores de ζ positivos, pois o pH final da dispersão é menor do que o PI da zeína.

Sabe-se que a estabilidade de um sistema coloidal está diretamente relacionada à magnitude do seu ζ , o qual indica a carga superficial das NPs, a qual por sua vez é controlada pela ionização dos grupos presentes em sua superfície (GAZORI *et al.*, 2009). Um ζ elevado (± 30 mV) indica que o sistema possui estabilidade eletrocinética, uma vez que mantém a espessura da dupla camada elétrica, prevenindo a agregação devido às fortes forças repulsivas entre as partículas (AVADI *et al.*, 2010; PARVEEN *et al.*, 2010).

As suspensões foram analisadas através da técnica de DLS. O ζ de todas as formulações manteve-se estável até o 25^o e 30^o dias para as amostras A4 e A3-A5, respectivamente. Após 45 dias de armazenamento, a amostra A4 apresentou um valor de ζ praticamente nulo, o que demonstra que o sistema não é mais estável. Coerentemente com esse resultado, o tamanho médio do diâmetro das partículas aumentou a partir do 30^o dia de armazenamento, demonstrando uma agregação das partículas (Figura 42 B). A distribuição do tamanho das NPs ficou na faixa 140 a 200 nm com uma PDI de 0,15 a 0,2 (Figura 43). Todas as amostras obtidas foram monodispersas e com baixo valor de diâmetro de partícula e de PDI até o período de 30 dias. Após 45 dias de armazenamento as amostras A3 e A4 apresentaram um grande aumento no tamanho e a presença de uma população de partículas em 1000 nm. O aumento no PDI também foi observado. Já para a amostra A5 o aumento no tamanho foi de apenas 10 nm e no que se refere ao PDI ocorreu aumento de 0,15 para 0,25. A amostra A3, que possui um pH = 5,6, apresentou um tamanho de 170 nm. Já a amostra A4 apresentou um tamanho de 140 nm em pH = 6,5.

Figura 42 - Tamanho e ζ das suspensões (■)A3, (●) A4 e (▲) A5 em relação ao tempo(dias) mantidos em recipientes de cor transparente a uma temperatura de 25°C.

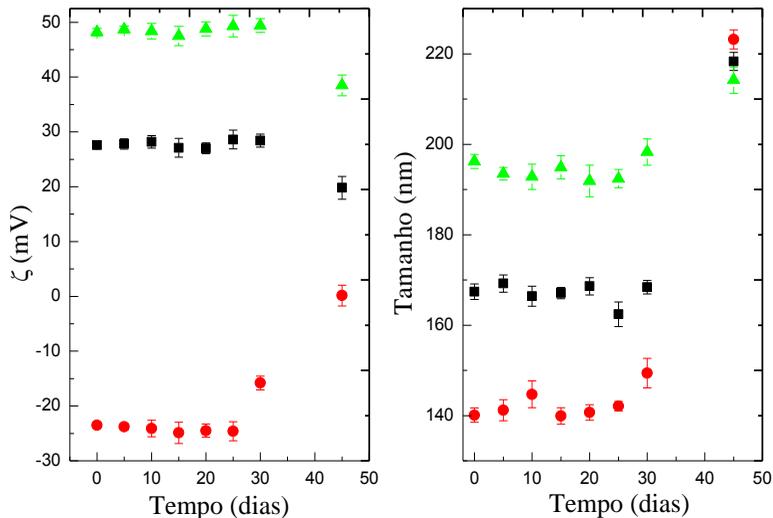
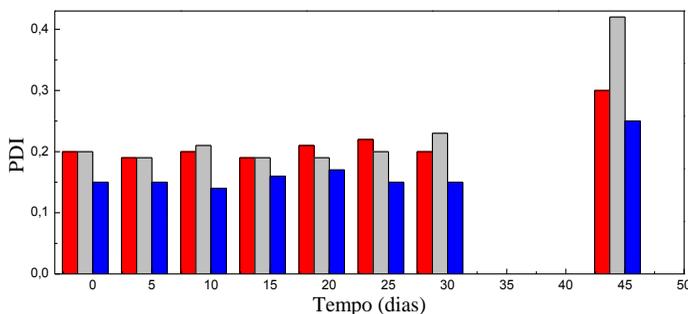


Figura 43 - PDI em função do tempo (dias) das amostras A3 (■); A4 (■) e A5 (■).



O monitoramento pela análise do pH em função do tempo, assim como o ζ , também é de suma importância por resultar em informações relevantes sobre a estabilidade da formulação, uma vez que alterações deste

parâmetro podem ser indício da degradação do polímero ou de algum outro componente da mesma, ou até mesmo indicar um processo de difusão da substância ativa, do interior da partícula para o meio aquoso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A Tabela 14 expressa os valores referentes ao pH inicial das formulações bem como durante armazenamento em temperatura ambiente. Pode-se observar que durante o período avaliado o pH de todas as formulações estudadas manteve-se estável, sem sofrer mudanças.

A amostra A3 apresentou valores de pH entre 5,49 e 5,52, a A4 pH de 6,47 a 6,21 e a A5 pH entre 3,89-3,86. O pH da amostra onde as partículas foram revestidas com CS encontra-se significativamente abaixo do PI da zeína pois a CS é previamente dissolvida em solução de ácido acético diluída, o que acarreta a queda do pH (Tabela 14). De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações apresentaram e mantiveram os valores de pH compatíveis com o pH da pele, o qual variou de 4,0 a 7,0 durante todo o período estudado. As formulações tópicas devem apresentar valores nesta faixa, pois do contrário podem provocar alterações no pH da pele (POLETTI *et al.*, 2011).

Tabela 14 – Determinação do pH durante os 45 dias de experimento.

Tempo (dias)	pH		
	A3	A4	A5
0	5,51	6,46	3,87
5	5,52	6,46	3,86
10	5,49	6,44	3,89
15	5,51	6,46	3,86
20	5,50	6,45	3,87
25	5,52	6,44	3,86
30	5,50	6,47	3,89
45	5,49	6,21	3,87
Média*	5,50	6,42	3,87
DP**	0,01	0,09	0,01

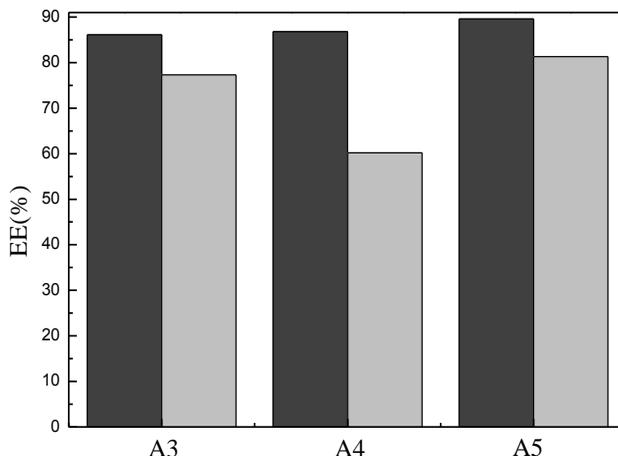
*Média de todas as amostras

**Desvio padrão

Os valores encontrados para EE no tempo zero e após 30 dias de armazenamento são apresentados na Figura 44. Foi realizado o cálculo da perda total de teor (inicial – final dos 30 dias), obtendo uma perda de 10,2% para a amostra A2, 30,0% para A3 e 9,3% para A4. Estes resultados

demonstraram que o sistema contendo CS foi o mais efetivo no requisito de retenção do princípio ativo dentro da NP.

Figura 44 - EE no tempo zero (■) e 30 dias (□).



3.3.6 Liberação *in vitro*

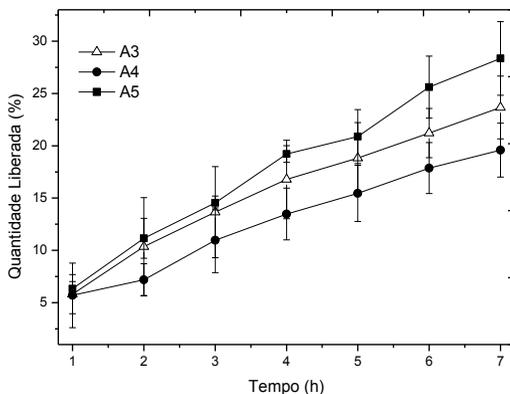
Os experimentos de liberação consistem em uma ferramenta útil em um estágio inicial do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados especialmente destacando as interações entre os excipientes e liberação do fármaco. A taxa de liberação depende das propriedades físico-químicas e físicas das NPs e do ativo.

Os perfis de liberação cinética de NPs em zeína foram avaliados e são mostrados na Figura 45. A quantidade de T4OL liberado foi avaliada retirando-se alíquotas a cada 1 h, com posterior análise por HPLC. A amostra A5 apresentou uma liberação de 28,3% do fármaco em 7 h de experimento. A amostra A3 apresentou uma maior quantidade de fármaco liberado do que a amostra A4 (23,6 *versus* 19,6% em 7 h).

Todas as amostras não apresentaram uma liberação imediata, ou *burst effect*, no perfil da curva de liberação controlada do T4OL a partir da matriz de zeína. Isso reforça a ideia de que não há quantidade significativa de moléculas adsorvidas na superfície do material, o que valida a metodologia de impregnação do ativo em nanopartículas, bem como a eficácia do sistema de liberação em si.

Deve ser destacado que nem todo T4OL foi eliminado durante 7 h, no máximo 28% do princípio, comprovando que a imobilização em nanoesferas de zeína gera uma ação de liberação controlada do T4OL.

Figura 45 - Perfil da liberação *in vitro* do T4OL na presença e ausência de CS (média \pm DP, $n = 3$).



3.3.7 Permeação e retenção cutânea

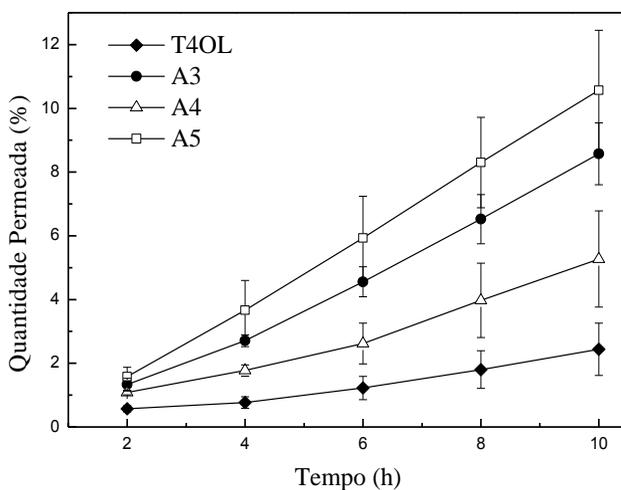
As NPs de zeína na presença ou ausência de CS foram avaliadas quanto a capacidade de permear na pele o fármaco T4OL, encapsulado nas NPs. O estudo foi realizado para quatro formulações, sendo uma solução de T4OL (controle), suspensão de NPs de zeína em pH 5,6 (A3), em pH 6,5 (A4), e revestida com CS em pH 3,8 (A5).

A permeação cutânea, através da pele de orelha suína, foi realizada durante 10 h utilizando célula de difusão de Franz, que é uma técnica amplamente empregada por apresentar resultados confiáveis com baixo custo. Nos experimentos foi utilizado como fluido receptor o tampão fosfato com 1% de tween 80 para manter as condições *sink*.

Após experimentos de permeabilidade, a concentração de T4OL no compartimento receptor foi quantificada por HPLC, obtendo-se um gráfico que correlaciona a quantidade permeada (%) em função do tempo (h). Este gráfico permite visualizar o perfil cinético de difusão e, a partir dele, calcular os parâmetros de permeabilidade. Na análise dos perfis de permeação das diferentes formulações testadas (Figura 46) tem-se que o fármaco apresentou maiores valores de permeação quando incorporado nas NPs, comparativamente à solução de T4OL (controle). Quanto à quantidade

permeada nos diferentes intervalos de tempo, notaram-se diferenças entre os sistemas com o tempo. Também se observou um aumento constante na quantidade de fármaco permeado com o tempo para todas as formulações. Após 10 h de experimento, a quantidade média acumulada de T4OL permeado foi 10,6 %; 5,3%; 8,5% e 2,4 % para A5, A4, A3 e solução de T4OL, respectivamente. As NPs revestidas com CS (A5) apresentaram maior perfil de permeação em relação às amostras na ausência de CS, A4 e A3.

Figura 46- Perfis de permeação do T4OL através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações (média \pm SD, $n = 3$).



O caráter catiônico baseado nos grupos amino primários é o principal responsável pelas propriedades associadas a CS, tais como o controle da liberação de fármacos, aumento da permeabilidade nas membranas e mucoadesão. Além disso, a CS apresenta boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. O efeito promotor de permeação da CS também está relacionado com as cargas positivas do polímero, as quais podem interagir com ácidos graxos livres presentes no estrato córneo, através de interações eletrostáticas, resultando na reorganização estrutural das proteínas associadas às junções celulares (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012).

A zeína também apresenta bom potencial de liberação tanto *in vitro* como *in vivo* para aplicação biomédica. Isso se deve principalmente a sua

bio- e citocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, seu caráter extremamente hidrofóbico e por possuir grupos funcionais (amina, amida, carboxila, hidroxila e fenólico) que possibilitam a modificação da superfície (alteração das cargas), dependendo do pH. Portanto a proteína pode ser facilmente modulada para responder aos diferentes valores de pH do meio, para liberação de vários tipos de produtos farmacêuticos (REDDY; YANG, 2011).

Baseado nas diferenças físico-químicas, discutidas no item 3.3.3, entre os três sistemas, observou-se que o sistema A5 possui maior carga positiva em relação ao sistema A3. Já a amostra A4, por possuir carga negativa, apresenta maior dificuldade de permeação. Portanto, este fato pode ter contribuído para as diferenças encontradas no perfil de permeação do fármaco, uma vez que quanto maior a carga da partícula, maiores as interações eletrostáticas com a camada externa da pele. Isso resulta na reorganização estrutural das proteínas nesta camada e conseqüentemente em maior permeação.

Basicamente, a penetração de NPs através da pele ocorre principalmente por duas vias principais: (i) através da interação com a matriz lipídica intercelular e (ii) através da rota folicular. Estudos têm demonstrado que as NPs podem atingir os folículos pilosos profundos após a aplicação tópica na pele humana ou animal, e alguns estudos têm sugerido que a entrega folicular é mais eficiente com NPs menores, especialmente aquelas com diâmetro menor que 300 nm. As NPs com carga negativa apresentam menor afinidade com a camada externa da pele (menor retenção na epiderme), assim sugere-se que estas partículas podem ser preferencialmente administradas por via folicular. Estudos têm demonstrado que a preferência por esta rota também é favorecida para NPs com tamanho menores (CAON *et al.*, 2013).

NPs com carga negativa reduzem a interação com fosfolípidos de carga negativa presentes no estrato córneo, instruindo o sistema para ser administrado pela rota folicular. Por outro lado, os sistemas com carga positiva têm uma grande afinidade com a camada externa da pele, que apresenta carga negativa, resultando em um fluxo mais lento pela rota folicular (maior tempo de latência) (CAON *et al.*, 2013).

O tempo de latência e o coeficiente de permeabilidade para os diferentes sistemas investigados após 10 horas de experiência de permeação foram calculados e estão apresentados na Tabela 15. Os valores do tempo de latência variaram de 0,53-0,82 h. Todos os sistemas preparados apresentaram maior tempo de latência em relação à solução T4OL (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$), ou seja, atingem a solução receptora mais lentamente. Na comparação entre as NPs, tem-se que os sistemas com carga

positiva apresentaram maior tempo de latência, provavelmente pela interação com a camada externa (matriz lipídica) da pele.

Em relação ao coeficiente de permeabilidade, os sistemas nanoparticulados apresentaram valores mais elevados do que a solução de T4OL (controle), e foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$, ANOVA / Tukey).

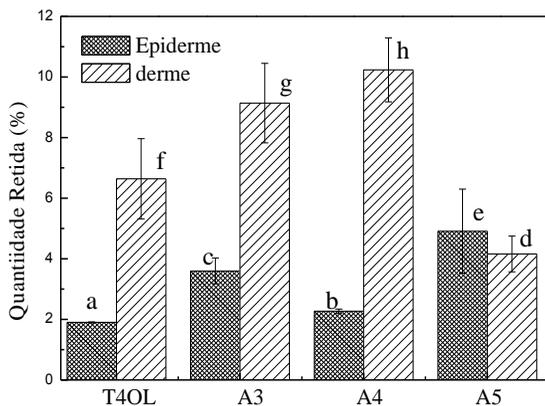
Tabela 15 - Parâmetros de permeação dos diferentes sistemas com T4OL ($n = 3$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Amostra	Tempo de latência (h)	Coeficiente de Permeabilidade(cm s^{-1})
Solução de T4OL	$0,54 \pm 0,05^a$	$(3,7 \pm 1,4) \times 10^{-7}^a$
A3	$0,82 \pm 0,06^d$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}^c$
A4	$0,65 \pm 0,33^b$	$(8,3 \pm 2,4) \times 10^{-7}^b$
A5	$0,69 \pm 0,08^c$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-6}^d$

A quantidade de T4OL retida na derme e na epiderme também foi avaliada para todos os sistemas (Figura 47). As amostras A3, A4 e T4OL apresentaram maior retenção na derme do que na epiderme, somente com a amostra A5 ocorreu o inverso. Os dados mostram que em relação à retenção na derme e epiderme todas as amostras foram significativamente diferentes entre si (ANOVA/ Tukey, $p < 0,05$).

Desta forma, o estudo efetuado em relação à permeação e retenção do T4OL foi influenciado pelo valor da carga e tamanho das NPs. O sistema com maior valor de carga positiva também apresentou maior tamanho (A5), resultando em um bom coeficiente de permeação, porém com tempo de latência maior e menor retenção na camada da derme. Já o sistema A4, por apresentar carga negativa e menor tamanho, resultou em valores contrários em relação aos parâmetros de permeação e também em relação à quantidade retida na derme.

Figura 47 – Porcentagem de T4OL retida na derme e na epiderme após 10 horas. Média \pm SD ($n = 3$). Utilizaram-se os testes ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).



Dessa maneira, as NPs de zeína satisfazem algumas das premissas iniciais deste trabalho, que consistiam em comprovar sua utilização tópica por permeação na pele, sem os efeitos inconvenientes da administração convencional. Tais resultados auxiliam no desenvolvimento de um novo método e possibilitam uma nova alternativa às pessoas com câncer de pele. Estes resultados sugerem que o sistema estudado apresenta consistência e adequação para aplicação tópica proposta.

CONCLUSÕES

As NPs de zeína foram preparadas com êxito pelo método de precipitação antissolvente. As NPs com diâmetros médios de 200 nm e com um baixo PDI foram observadas em todos os sistemas desenvolvidos. Também foram obtidas NPs com elevada EE do T4OL, alcançando em alguns sistemas 91%.

Os sistemas utilizando os SPEs limoneno e propilenoglicol demonstraram melhor estabilidade físico-química durante 30 dias armazenamento a 25 °C.

O teste de liberação *in vitro* mostrou que para os sistemas com SPEs ocorreu uma liberação mais controlada, apresentando como melhor modelo matemático o de ordem zero para o perfil de liberação dos sistemas analisados. Isto revela que a liberação do fármaco ocorreu a uma velocidade constante e é independente da concentração de T4OL, o que é ideal para atingir uma ação farmacológica prolongada.

A eficiência da permeação e a retenção cutânea da encapsulação do T4OL em NPs de zeína, na presença dos SPEs limoneno e propilenoglicol, foram maiores quando comparada ao sistema na ausência destes ou com uma solução controle. Este resultado sugere que sistemas com melhores características físico-químicas resultaram em uma melhor interação com a camada externa (matriz lipídica) da pele.

O revestimento das NPs com CS, através das interações eletrostáticas e pelas fortes ligações de hidrogênio, foi confirmado pelas alterações no tamanho de partícula, pelos valores do potencial zeta e pelo estudo da morfologia. Os resultados mostram claramente nanoestruturas do tipo esféricas e com a camada adsorvida de quitosana.

O excelente revestimento com CS nas NPs de zeína resultou também numa ótima estabilidade durante 45 dias com armazenamento a 25 °C. Finalmente, as NPs na presença ou ausência de CS mostraram forte capacidade para interagir com a pele através de forças eletrostáticas, o que destaca o seu potencial como veículo para a entrega do T4OL.

REFERÊNCIAS

AHMED, O.; ELZOGHBY, W. M. S.; NAZIK A. ELGINDY. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 38-49, 2012.

AMNUAIKIT, C. *et al.* Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1–2, p. 167-178, 2005.

ANVISA. **Resolução RE nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003.

_____. guia de estabilidade de produtos cosméticos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf> > Acesso em : 9 de janeiro de 2004.

ASHOK P. *et al.* Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. **Soft Matter**, v. 6, p. 6192–6199, 2010.

ASHOK R. P. *et al.* Sodium Caseinate Stabilized Zein Colloidal Particles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 23, p. 12497-12503, 2010.

AVADI, M. R. *et al.* Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.

BARRATT G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21-37, 2003.

BARRY, B. **Transdermal drug delivery**, 499-533, 2002.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S31-S40, 2002.

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENNA, E.; PIRES, A. T. N. Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 839-844, 2009.

BÉDARD, M. F. *et al.* Polymeric microcapsules with light responsive properties for encapsulation and release. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 158, n. 1–2, p. 2-14, 2010.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463-469, 2012.

BRAHATHEESWARAN D. *et al.* Biomimetic smart nanocomposite: in vitro biological evaluation of zein electrospun fluorescent nanofiber encapsulated CdS quantum dots. **Biofabrication**, v. 4, p. 14pp, 2012.

BRASIL. **INCA lança estimativas de câncer 2012 com sete novas localizações de tumores**. Rio de Janeiro. 2011

_____. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

CABRA, V. *et al.* Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1110-1118, 2006.

CARSON, C. F.; K. A. H.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CAL K, K. M. Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, p. 265-267, 2006.

CALCABRINI, A. *et al.* Terpinen-4-ol, the main component of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 2, p. 349-360, 2004.

CALLANDER, J. T.; JAMES, P. J. Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 271-278, 2012.

CAON, T. *et al.* Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 0, 2013.

CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2007.

CASTILHO, I. G.; SOUSA, M. A. A.; LEITE, R. M. S. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 173-178, 2010.

CHIEH-SHAN WU, Y.-J. C. *et al.* Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 13, 2012.

CHO, S. Y.; LEE, S. Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1234-1239, 2010.

CÔRREA, G. M. Tratamento de hiperchromia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**, v. 17, 2005.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COUVREUR, G. B., *et al.* Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

GIACOMELLI, L.; BORSALI, R. Phosphorylcholine-Based pH-Responsive Diblock Copolymer Micelles as Drug Delivery Vehicles: Light Scattering, Electron Microscopy, and Fluorescence Experiments. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 817-828, 2006.

CUVREUR, P. D., C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles – Current Possibilities and Future-Trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 2-13, 1995.

DASH, M. *et al.* Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DAZARD, J. E. *et al.* Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. **Oncogene**, v. 19, n. 33, p. 3693-3705, 2000.

DEL RIO-SANCHO, S. *et al.* Transdermal absorption of memantine–Effect of chemical enhancers, iontophoresis, and role of enhancer lipophilicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 164-170, 2012.

DURACHER, L. *et al.* The influence of alcohol, propylene glycol and 1, 2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin. **International journal of pharmaceutics**, v. 374, n. 1, p. 39-45, 2009.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4–5, p. 203-222, 2008.

DE SOUSA, F. O. *et al.* Effect of zein on biodegradable inserts for the delivery of tetracycline within periodontal pockets. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 27, n. 2, p. 187-200, 2012.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FIALHO, S. L. *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FIGUEIREDO, L. C. *et al.* Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FRANCESCA MONDELLO, F. D. B. *et al.* In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 158, 2006.

FRIEDMAN, R.; SHERMAN, C. **Câncer de Pele**. Fundação Oncocentro São Paulo. 1999

FORMARIZ, T. P. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, 2004.

GAIKWAD, A. K. Transdermal drug delivery system: Formulation aspects and evaluation. **Comprehensive Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 1-10, 2013.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 119-131, 2006.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24-34, 2007.

GARBE, C. *et al.* Diagnosis and treatment of melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 15, p. 2375-2390, 2012.

GAROZZO, R. T. *et al.* In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 806-808, 2009.

GAUCHER, G. *et al.* Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 109, n. 1-3, p. 169-188, 2005.

GAZORI, T. *et al.* Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 599-606, 2009.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.

GIORDANI, C. *et al.* Interaction of tea tree oil with model and cellular membranes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 15, p. 4581-4588, 2006.

GOMEZ-ESTACA, J. *et al.* Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 82-91, 2012.

GÓMEZ-MARTÍNEZ, D.; ALTSKÄR, A.; STADING, M. Correlation between viscoelasticity, microstructure, and molecular properties of zein and pennisetin melts. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 3, p. 2245-2251, 2012.

GOODMAN, M.; BARRY, B. W. Lipid-protein-partitioning (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 29-40, 1989.

GREAY, S. J. *et al.* Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 877-888, 2010.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, n. DTI-2-Guterres-et-al, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S. *et al.* Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57-64, 2008.

HAMMER, K. A. *et al.* A review of the toxicity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 616-625, 2006.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

HERNANDEZ-PIGEON, H. *et al.* UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF - Implication in extracellular matrix remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 11, p. 8157-8164, 2007.

HU, B. *et al.* Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7451-7458, 2008.

HU, D. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 545-552, 2012.

HURTADO-LÓPEZ, S. M. Formulation and characterisation of zein microspheres as delivery vehicles. **J. Drug Del. Sci. Tech.**, v. 15 n. 4, p. 267-272, 2005.

KIM, F. C. *et al.* Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Oil and Its Components. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2849-2854, 2004.

IBRAHIM SA, L. S. Effects of chemical enhancers on human epidermal membrane: Structure-enhancement relationship based on maximum enhancement (E(max)). **J. Pharm Sci.**, v. 98, n. 3, p. 926-944, 2009.

IRACHE, J. M. *et al.* Optimization and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by a coacervation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 126, n. 1-2, p. 103-109, 1995.

ISAAC, V. L. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

JACK, A. B. *et al.* The treatment of melanoma with an emphasis on immunotherapeutic strategies. **Surgical Oncology**, v. 15, p. 13-24, 2006.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 83-97, 2001.

KATHERINE A.; HAMMER, C. F. C.; THOMAS V. RILEY. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 909-915, 2012a.

_____. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 909-915, 2012b.

NINOMIYA, N. M., *et al.* The Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and Its Main Component, Terpinen-4-ol Protect Mice from Experimental Oral Candidiasis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 6, p. 861-865, 2012.

KIM, J.; VAN DER BRUGGEN, B. The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: Review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 7, p. 2335-2349, 2010.

KIM, S.; XU, J. Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2008.

KLINE, S. R. K.; E.W. Aggregation of Colloidal Silica by n-Alkyl Sulfates. **Langmuir**, v. 12, p. 2402-2407, 1996.

KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KRISHNAIAH, Y. S. R.; SATYANARAYANA, V.; BHASKAR, P. Influence of limonene on the bioavailability of nicardipine hydrochloride from membrane-moderated transdermal therapeutic systems in human volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 247, n. 1-2, p. 91-102, 2002.

KRUTMANN, J. The role of UVA rays in skin aging. **European Journal of Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 170-171, 2001.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LANGER, K. *et al.* Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 169-180, 2003.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. D. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LAU, E. *et al.* Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 277-293, 2013.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 327-341, 2004.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 563-569, 2002.

LI, P.; ZHANG, C. L.; SUN, L. M. Characterization, Antibiofilm, and Mechanism of Action of Novel PEG-Stabilized Lipid Nanoparticles Loaded with Terpinen-4-ol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6150-6156, 2012.

LINGYUN C. *et al.* In Vitro Study of the Release Properties of Soy-Zein Protein Microspheres with a Dynamic Artificial Digestive System. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 9861-9867, 2010.

LIU, X. *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 2, p. 247-253, 2009.

LUO, Y. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 942-951, 2010.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011a.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011b.

LUO, Y. *et al.* Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 836-843, 2012.

MARCHESSAULT, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2005.

MARY C. Fabrication and characterization of DNA-loaded zein nanospheres. **J. Nanobiotechnology**, v. 10, n. 44, p. 1-13, 2012.

MATHEW, S. T.; DEVI, S. G.; SANDHYA, K. V. Formulation and evaluation of Ketorolac trometamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 8, n. 1, p. E1-E9, 2007.

MAYORGA, R. C. P. Estudo da Penetração Cutânea do Flurbiprofeno. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 883-888, 2007.

MELLO, V. A. D.; RICCI-JÚNIOR, E. Encapsulation of naproxen in nanostructured system: structural characterization and in vitro release studies. **Química Nova**, v. 34, p. 933-939, 2011.

MOMANY, F. A. *et al.* Structural characterization of alpha-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 543-457, 2006.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 263-269, 2009.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. **Structure and function of skin**. 2006. 1-19

MORCIA, C.; MALNATI, M.; TERZI, V. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2012.

MÜELLER B. G., K. T. Camouflage nanospheres: A new approach to bypassing phagocytic blood clearance by surface modified particulate carriers. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 3, p. 67-70, 1993.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. 1999.

NA., P. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv**, v. 60, n. 4, p. 110, 1985.

NATALIE A. *et al.* Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 343-351, 2013.

NELSON, E. O. Genetic modification of protein quality implants. v. 21, p. 171-194, 1969.

NIAZY, E. M. Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 97-100, 1991.

NONTHANUM, P.; LEE, Y.; PADUA, G. W. Effect of γ -Zein on the Rheological Behavior of Concentrated Zein Solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1742-1747, 2012.

OKUYAMA, K. *et al.* Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 3, p. 237-247, 2000.

OTBERG, N. *et al.* Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. **J Investig Dermatol**, v. 122, n. 1, p. 14-19, 2004.

PALUDETTI, L. A. Critérios para preparação de líquidos para administração por via oral. **International journal of pharmaceutical compounding**, v. 6, n. 4, p. 192-197, 2004.

PAN, H. *et al.* Quantitation of soluble aggregates in recombinant monoclonal antibody cell culture by pH-gradient protein A chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 388, n. 2, p. 273-278, 2009.

PARRIS, N. *et al.* Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.

PARRIS, N.; HICKS, B. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.

PARVEEN, S. *et al.* Retraction notice to "Enhanced Antiproliferative Activity of Carboplatin loaded Chitosan-Alginate Nanoparticles in Retinoblastoma Cell Line" [Acta Biomaterialia 6 (2010) 3120–3131]. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 8, p. 3120-3131, 2010.

PATEL, A. R. *et al.* Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 423-429, 2012.

PATOMPONG KHAW-ON, R. B. Induction of Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Pathways in the Human Leukemic MOLT-4 Cell Line by Terpinen-4-ol. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, 2012.

PATRICIAMATHIAS, A. S. *et al.* In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 8, 2012

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 919-927, 2012.

POLETTO, F. *et al.* Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. **Nanocosmetics and Nanomedicines**: Springer Berlin Heidelberg, 2011. cap. 3, p.49-68. ISBN 978-3-642-19791-8.

POPIM, R. C., *et al.* Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1331-1336, 2008.

PRASANNA, B. M. *et al.* Quality protein maize. **Current Science**, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 115-124, 2004.

PUZZI, L. B. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med. J.**, v. 124, n. 2, 2006.

QIN, C. *et al.* Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 367-374, 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D. A., E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAY, S. D. Potencial aspects of chitosan as pharmaceutical excipient. v. 68, n. 5, p. 619-622, 2011.

REDDY, N.; YANG, Y. Potential of plant proteins for medical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 490-498, 2011.

REICHLING, J. *et al.* In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

RICOTTI, C., *et al.* Malignant Skin Neoplasms. **The Medical clinics of North America**, v. 93, n. 6, p. 1241-1264, 2009.

ROCHA, F. P. D. *et al.* Especificidade e sensibilidade de rastreamento para lesões cutâneas pré-malignas e malignas. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 101-106, 2002.

ROSEN, M. J. **Surfactant and Interfacial Phenomena**. Second ed., New York: Wiley Interscience, 1989.

RYAN, K. *et al.* Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 411-420, 2012.

SAMPAIO, S. A. P. R., EVANDRO A. **Dermatologia**. 2001. 1156 ISBN 8574040177

SANTOS BA, R.-C. D. *et al.* Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca^{2+} current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 539-543, 2011.

SANTOS, M. M. R. D.; FIALHO, S. L. Nanopartículas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 52-59, 2007.

SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 2, p. 245-250, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHARTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**. 2007. 191 ISBN 978-3-540-71950-2.

SCHAFFAZICK, A. R. *et al.* Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SHAW, D. G. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 1970.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SIGMA. **Zein from maize**. 2003.

SILVA, J. A. *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SILVA, K. E. *et al.* Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SINHA, V. R. *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.

SOENGAS, M. S. L. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001.

SOUSA, F. *et al.* NMR techniques in drug delivery: Application to zein protein complexes. **International journal of pharmaceutics**, 2012.

SOUZA, S. R. P. D.; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P. D. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 588-598, 2004.

STEGE, H. *et al.* Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1790-1795, 2000.

SVOBODOVA, A. R. *et al.* DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 407-412, 2012.

TAGA I; ALTOSAAR I. Plant essential oils and mastitis disease: their potential inhibitory effects on pro-inflammatory cytokine production in response to bacteria related inflammation. **Nat Prod Commun.**, v. 7, n. 5, p. 672-682, 2012.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 128-137, 2012.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2012.

XU, H. *et al.* Hollow nanoparticles from zein for potential medical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 45, p. 18227-18235, 2011.

YANG, Z. *et al.* Enhancement of skin permeation of bufalin by limonene via reservoir type transdermal patch: Formulation design and biopharmaceutical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 231-240, 2013.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, 2009.

ZHONG, Q.; TIAN, H.; ZIVANOVIC, S. Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 2, p. 255-270, 2009.

ZOU, T. *et al.* Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2012.