



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Anivaldo Pereira Duarte Junior

**Preparação de carreadores lipídicos
nanoestruturados a partir de cera de
carnaúba e óleo de pracaxi contendo
dexametasona para tratamento tópico de
inflamações cutâneas**

Recife

2016

Anivaldo Pereira Duarte Junior

**Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados
a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi
contendo dexametasona para tratamento tópico de
inflamações cutâneas**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica

Orientador: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Coorientador: Profa. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

Recife
2016

Ficha Catalográfica elaborada
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

D812p Duarte Junior, Anivaldo Pereira.
Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo dexametasona para tratamento tópico de inflamações cutâneas / Anivaldo Pereira Duarte Junior. – 2016.
190 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Nanopartículas. 2. Inflamação. 3. Dexametasona. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Título.

620.5 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-187)

Anivaldo Pereira Duarte Junior

**Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados
a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi
contendo dexametasona para tratamento tópico de
inflamações cutâneas**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Trabalho aprovado. Recife, 20 de maio de 2016.

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Beate Santos Saegesser (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Eliana Martins Lima (Examinador interno)
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Leila Bastos Leal (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Francisco Humberto Xavier Junior (Examinador interno)
Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica

Recife
2016

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus e meus pais Anivaldo Pereira Duarte e Ana do Socorro Souza Duarte, pelos ensinamentos, incentivo a sempre buscar conhecimento e o apoio dado em minhas decisões.

À minha esposa Patricia Feitosa Silva Duarte, que sempre esteve ao meu lado durante esse período longe de casa e que me proporcionou a alegria de ser pai ano passado.

Ao meu filho Lucas Feitosa Duarte, que trouxe, a cada sorriso, alegria para nossas vidas.

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, pela confiança depositada e pela orientação durante o período em que me acolheu no laboratório.

À Profa. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa, pela coorientação e também pelas contribuições dadas em Belém, no período em que desenvolvi uma parte do trabalho na UFPA.

À Profa. Dra. Eliana Martins Lima que me recebeu de braços abertos no Farmatec em Goiânia e me deu condições de desenvolver os carreadores lipídicos propostos no projeto deste doutorado.

À Profa. Dra. Maria Fernanda Pimentel pelas contribuições valiosas no desenvolvimento do planejamento fatorial e pelos ensinamentos sobre o tema.

Aos colegas do NanoFarm em Belém e do Farmatec em Goiânia, pela amizade e os bons momentos de convivência que serão sempre lembrados com carinho.

Aos colegas do laboratório de sistemas de liberação controlada (SLC) que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e, acima de tudo, pelo companheirismo e amizade construída durante o período em que trabalhei no SLC.

A todos os técnicos e funcionários do LIKA que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

*Ice is forming on the tips of my wings
Unheeded warnings, I thought, I thought of everything
No navigator to find my way home
Unladen, empty and turned to stone
A soul in tension – that's learning to fly
Condition grounded but determined to try
(Pink Floyd. "Learning to fly.")*

Resumo

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são sistemas coloidais que apresentam potencial de uso tópico. A utilização de constituintes de origem natural se apresenta como alternativa aos lipídios sintéticos, por isso a cera de carnaúba e óleo de pracaxi foram utilizados na preparação de CLN contendo dexametasona (DXM) com finalidade de tratar inflamações cutâneas. A caracterização do óleo foi realizada através da determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-FID), densidade, viscosidade dinâmica e cinemática utilizando viscosímetro rotacional e EHL requerido. A elaboração de diagrama pseudoternário de fases (óleo/tensoativos/água), avaliação da mistura de cera/óleo por DSC e DRX, determinação do coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi/água e a solubilidade em óleo de pracaxi também foram realizadas. A metodologia analítica por CLAE acoplada a detector UV para quantificação da DXM foi validada e um planejamento experimental fracionado seguido de composto central foi executado com objetivo de obter CLN em torno de 200 nm, $PDI \leq 0,4$ e maior eficiência de incorporação da DXM. O perfil e modelo cinético da liberação *in vitro* foi estabelecido e avaliou-se a penetração e/ou permeação cutânea *in vitro* da DXM em pele de orelha de porco utilizando células de difusão de Franz. O óleo de pracaxi contém 17 % de ácido behênico e densidade de 0,90–0,85 g/cm³, viscosidade dinâmica de 65,75–7,77 mPa/s e cinemática de 72,99–9,09 mm²/s entre 30–100 °C. O EHL requerido do óleo de pracaxi foi 8,8 para Tween[®] 80 e Span[®] 60 (40:60) e o diagrama pseudoternário apresentou região de emulsão líquida leitosa com proporção de água a partir de 38 % e a ocorrência de nanoemulsão (tamanho de 131,6–258,3 nm) com proporção de água de 87,5 %. As misturas lipídicas apresentaram índice de cristalinidade de 71,88 % e 31,93 % em comparação com a cera de carnaúba. O método analítico apresentou parâmetros de validação adequados e a solubilidade da DXM em óleo de pracaxi foi de 190,16 µg/mL. O log P da DXM em óleo de pracaxi/água foi de -0,4250. O CLN composto por DXM (0,15 %), lipídios 10 % (40 % de óleo de pracaxi), tensoativos 5 %, obtido com um ciclo de homogeneização e pressão de 600 bar apresentou tamanho de 173,26 nm, PDI 0,166 e eficiência de incorporação de DXM de 49,30 %. O perfil cinético das formulações CLN-DXM e Gel DXM foi ajustado por modelo linear, com velocidades de $11,59 \pm 0,49$ µg/cm²/h e $2,42 \pm 0,25$ µg/cm²/h, respectivamente. Entretanto, a formulação Gel CLN-DXM apresentou perfil cinético melhor ajustado ao modelo de Higuchi, de acordo com a equação $Q = 15,64.t_{(2-12h)}^{0,5} - 18,432$ ($r^2=0,9903$). Os ensaios em pele não apresentaram absorção percutânea. A retenção da DXM no estrato córneo foi de $0,80 \pm 0,13$, $0,77 \pm 0,15$ e $0,16 \pm 0,03$ µg/cm² e na pele remanescente de $0,96 \pm 0,17$, $0,49 \pm 0,18$ e $0,13 \pm 0,03$ µg/cm² para as formulações Gel CLN-DXM, Gel DXM e Creme DXM, respectivamente. A formulação Gel CLN-DXM promoveu penetração significativamente maior da DXM nas camadas profundas da pele em comparação às demais formulações, apresentando assim, possibilidade de exercer maior eficácia terapêutica da DXM.

Palavras-chaves: Nanopartículas. Inflamação. Dexametasona.

Abstract

Nanostructured lipid carriers (NLC) are colloidal systems that have potential for topical drug delivery. The use of natural lipids is an alternative to synthetic lipids and therefore carnauba wax and pracaxi oil were used to obtain dexamethasone-loaded NLC to treat skin inflammation. Pracaxi oil characterization was performed by fatty acids determination using gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). Density, kinematic and dynamic viscosities using a rotational viscometer and required HLB value were determined. Furthermore, pseudo ternary phase diagram (oil/surfactants/water), dispersed systems evaluation, wax/oil lipid mixture investigation by x-ray diffraction and DSC, DXM partition coefficient in pracaxi oil/water and DXM solubility in pracaxi oil were determined. Analytical method for determining DXM content using HPLC coupled to an UV detector was validated. A fractional factorial and central composite designs to determine a CLN formulation with size around 200 nm, $PDI \leq 0.4$ and the best DXM incorporation efficiency was developed. The DXM in vitro release kinetic profile was evaluated and a kinetic model established. In vitro penetration and/or permeation in porcine ear skin using Franz diffusion cells was evaluated. Pracaxi oil contains 17 % of behenic acid and presents a density, dynamic and kinematic viscosities, between 30–100 °C, of 0.90–0.85 g/cm³, 65.75–7.77 mPa/s and 72.99–9.09 mm²/s, respectively. Pracaxi oil required HLB was 8.8 using Tween[®] 80 and Span[®] 60 (40:60) surfactants. Pseudo ternary phase diagram presented a milky liquid emulsion region starting with 38 % of water and the occurrence of nanoemulsion (size of 131.6–258.3 nm) at 87.5 % of water. Lipid mixtures of pracaxi oil/carnauba wax showed crystallinity index varying from 71.88 % to 31.93 % compared with carnauba wax. The analytical method was suitable for DXM determinations and the DXM solubility in pracaxi oil was 190.16 µg/mL. The log P value of DXM in pracaxi oil/water was –0.4250. The CLN consisted of DXM 0.15 %, 10 % lipids (40 % pracaxi oil), 5 % surfactants was obtained with one homogenisation cycle and 600 bar pressure, presented a particle size of 173.26 nm, PDI of 0.166 and DXM encapsulation efficiency of 49.30 %. The kinetic profile of CLN-DXM and DXM gel formulations was fitted by linear model, with speeds of 11.59 ± 0.49 µg/cm²/hr, and 2.42 ± 0.25 µg/cm²/hr, respectively. However, the CLN-DXM gel formulation presented kinetic profile best fitted to Higuchi model, according to the equation $Q = 15,64.t_{(2-12h)}^{0,5} - 18,432$ ($r^2=0,9903$). Skin penetration/permeation studies showed no percutaneous absorption. The formulations DXM-NLC/gel, DXM-gel and DXM cream showed DXM retention in stratum corneum layer of 0.80 ± 0.13 , 0.77 ± 0.15 e 0.16 ± 0.03 µg/cm², and in remaining skin of 0.96 ± 0.17 , 0.49 ± 0.18 e 0.13 ± 0.03 µg/cm², respectively. From these findings DXM-NLC/gel promoted significantly higher DXM penetration in deep skin in comparison with other DXM formulations, thus demonstrating a possible better DXM-NLC/gel therapeutic efficacy.

Key-words: Nanoparticles. Inflammation. Dexamethasone.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Gráfico com a temperatura de fusão de lipídios sólidos comumente utilizados para preparação de CLN.	22
Figura 2 – Ilustração com a classificação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.	25
Figura 3 – Descrição esquemática do método de homogeneização a alta pressão.	29
Figura 4 – Descrição esquemática dos métodos de emulsificação-difusão e emulsificação- evaporação de solvente.	33
Figura 5 – Descrição esquemática do método de microemulsão.	33
Figura 6 – Descrição esquemática do método de fluido supercrítico (PGSS).	36
Figura 7 – Representação gráfica da relação tamanho e número de nanopartículas no efeito oclusivo causado por CLN.	39
Figura 8 – Imagem do intumescimento e aumento do volume do estrato córneo promovido pelo efeito oclusivo causado por CLN.	39
Figura 9 – Fotografia de produtos disponíveis no mercado contendo nanopartículas lipídicas (NLS e CLN).	43
Figura 10 – Imagens da <i>Pentaclethra maculosa</i> (Pracaxi) - árvore, fruto e sementes.	45
Figura 11 – Fotografia da <i>Copernicia prunifera</i> (Carnaubeira).	48
Figura 12 – Estrutura química da dexametasona.	51
Figura 13 – Desenho esquemático da pele das camadas que constituem a pele e as rotas de permeação cutânea.	55
Figura 14 – Desenho esquemático de uma célula de difusão vertical do tipo Franz.	57
Figura 15 – Pele antes e após o procedimento de <i>tape stripping</i>	59
Figura 16 – Desenho esquemático de um processo hipotético e todas as etapas que o compõem.	61
Figura 17 – Representação gráfica de uma função quadrática de dois fatores em três dimensões.	68
Figura 18 – Representação gráfica de uma função quadrática de dois fatores em duas dimensões.	69
Figura 19 – Ilustração dos pontos fatoriais, axiais e central de um planejamento composto central para 3 variáveis.	70
Figura 20 – Diagrama pseudoternário de fases com a localização das 99 formulações analisadas.	78
Figura 21 – Imagem do banho-maria ultratermostatizado acoplado ao alimentador do homogeneizador a alta pressão.	81
Figura 22 – Diagrama da preparação da solução de trabalho de DXM (10 µg/mL) e dos pontos da curva analítica.	85
Figura 23 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras para avaliação da seletividade do método analítico.	87

Figura 24 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras de estrato córneo para avaliação da seletividade do método analítico.	88
Figura 25 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras de pele, sem a presença de estrato córneo, para avaliação da seletividade do método analítico.	89
Figura 26 – Imagem obtida no ensaio de determinação do coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi apresentando a separação das fases aquosa e oleosa após centrifugação.	93
Figura 27 – Representação gráfica da célula de Franz e as condições utilizadas na execução da liberação <i>in vitro</i> da DXM.	97
Figura 28 – Cromatograma dos FAMES obtidos do óleo de Pracaxi	103
Figura 29 – Gráfico representando a relação entre temperatura e viscosidade dinâmica, cinemática e densidade do óleo de pracaxi no intervalo de 30 °C a 100 °C.	105
Figura 30 – Gráfico da viscosidade dinâmica do óleo de pracaxi em diferentes temperaturas (40–100 °C) antes e após aquecimento a 100 °C durante 1 hora.	110
Figura 31 – Imagem das emulsões com diferentes valores de EHL após 7 dias de preparação.	111
Figura 32 – Imagem das emulsões de óleo de pracaxi após centrifugação a 1500, 2000 e 3500 rpm.	112
Figura 33 – Gráfico com índices de cremagem apresentados pelas emulsões de óleo de pracaxi em 7, 14 e 28 dias após a preparação.	113
Figura 34 – Gráfico com valores de pH apresentados pelas emulsões antes e após o ciclo gelo-degelo.	113
Figura 35 – Diagrama de fases pseudoternário das formulações avaliadas.	114
Figura 36 – Gráfico de DSC da cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.	116
Figura 37 – Gráfico de DRX da cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.	118
Figura 38 – Cromatograma típico da eluição da dexametasona.	121
Figura 39 – Curva analítica da DXM no intervalo entre 0,1 µg/mL e 2,6 µg/mL.	124
Figura 40 – Distribuição dos resíduos.	124
Figura 41 – Contrastes dos fatores e interações obtidas para as respostas: tamanho, PDI e %EE.	132
Figura 42 – Representação gráfica em 3D (superfície de resposta) do modelo quadrático proposto para resposta tamanho.	140
Figura 43 – Representação gráfica em 2D do modelo quadrático proposto para resposta tamanho.	141

Figura 44 – Microscopia eletrônica de transmissão do CLN	142
Figura 45 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da DXM.	143
Figura 46 – Concentração de DXM no EC, pele remanescente e meio receptor após 12 horas de experimento <i>in vitro</i> em pele de orelha de porco (n=6). . .	148
Figura 47 – Representação gráfica do teste ANOVA seguido pelo teste <i>t</i> da diferença entre as médias de concentração de DXM retidas no estrato córneo das formulações avaliadas.	185
Figura 48 – Representação gráfica do teste ANOVA seguido pelo teste <i>t</i> da diferença entre as médias de concentração de DXM retidas na pele remanescente das formulações avaliadas.	187
Figura 49 – Cromatogramas obtidos de amostras de CLN branco e CLN contaminado (<i>spiked</i>) com DXM.	188
Figura 50 – Cromatogramas obtidos de amostras de EC branco e EC contaminado (<i>spiked</i>) com DXM.	189
Figura 51 – Cromatogramas obtidos de amostras de pele branco e pele contaminada (<i>spiked</i>) com DXM.	190

Lista de tabelas

Tabela 1 – Fases e etapas ordenadas para realização de um planejamento experimental.	61
Tabela 2 – Padrões de confundimento de planejamentos experimentais de resolução III, IV e V.	64
Tabela 3 – Matriz de um planejamento fracionado 2_{III}^{3-1} , I=ABC.	65
Tabela 4 – Padrões de confundimento de um planejamento fracionado 2_{III}^{3-1}	65
Tabela 5 – Matriz de um planejamento fracionado 2_{IV}^{6-2} com fatores geradores I=ABCE e I=BCDF.	66
Tabela 6 – Padrões de confundimento de um planejamento fracionado 2_{IV}^{6-2}	67
Tabela 7 – Proporções de tensoativos e respectivos valores de EHL.	76
Tabela 8 – Proporções de óleo de pracaxi/tensoativos e água no diagrama de fases pseudoternário.	78
Tabela 9 – Fatores e níveis do planejamento experimental fracionado de resolução IV.	82
Tabela 10 – Respostas avaliadas e níveis pretendidos para o planejamento experimental.	82
Tabela 11 – Matriz do planejamento experimental fracionado com as variáveis codificadas e originais.	83
Tabela 12 – Fatores e níveis do planejamento composto central.	83
Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental de composição central com as variáveis codificadas e originais.	84
Tabela 14 – Pontos da curva analítica de DXM ($\mu\text{g/mL}$) e respectivas alíquotas de solução de trabalho e fase móvel.	86
Tabela 15 – Condições cromatográficas utilizadas para avaliação da robustez do método analítico.	92
Tabela 16 – Formulação de gel de Carbopol [®] utilizado como excipiente para as formulações.	96
Tabela 17 – Equações e instruções para elaboração das representações gráficas dos modelos de liberação avaliados.	98
Tabela 18 – Composição de ácidos graxos (%) do óleo de pracaxi.	102
Tabela 19 – Densidade, viscosidades dinâmica e cinemática do óleo de pracaxi no intervalo de 30°C à 100°C.	104
Tabela 20 – Viscosidade dinâmica de óleos vegetais em temperaturas de 20°C a 80°C.	107
Tabela 21 – Pico de fusão, temperatura <i>on-set</i> e calor de fusão da cera de carnaúba pura e das misturas binárias de cera:óleo de pracaxi nas proporções 90:10 e 60:40.	116
Tabela 22 – Condições cromatográficas do método de quantificação da DXM por CLAE acoplado a detector UV.	120

Tabela 23 – Parâmetros cromatográficos do pico da DXM obtido por CLAE acoplado a detector UV.	121
Tabela 24 – Visão geral dos resultados da validação do método analítico.	123
Tabela 25 – Precisão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) para quantificação de DXM em CLN, estrato córneo e pele remanescente.	125
Tabela 26 – Exatidão do método analítico para quantificação de DXM em CLN, estrato córneo e pele remanescente.	126
Tabela 27 – Robustez do método analítico para quantificação de DXM.	126
Tabela 28 – Solubilidade da DXM nas fases aquosa e oleosa, valor de P e coeficiente de partição ($\log P$) em temperatura de 25 °C.	127
Tabela 29 – EHL requerido das misturas cera:óleo utilizadas nas formulações preparadas nos planejamentos experimentais.	129
Tabela 30 – Formulações de CLN de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo DXM obtidas a partir de planejamento fatorial 2_{IV}^{6-2}	130
Tabela 31 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta tamanho.	131
Tabela 32 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta PDI.	135
Tabela 33 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta %EE.	136
Tabela 34 – Formulações de CLN de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo DXM obtidas a partir do planejamento composto central.	138
Tabela 35 – Efeitos estimados da resposta tamanho do planejamento composto central.	139
Tabela 36 – Formulação CLN-DXM selecionada no CCD.	141
Tabela 37 – Diferença estatística da liberação de DXM entre as formulações avaliadas.	144
Tabela 38 – Liberação da DXM ajustada por regressão linear segundo os modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.	145
Tabela 39 – Equações, constantes de liberação k e atrasos na liberação t_{Lag} das formulações avaliadas (n=4).	145
Tabela 40 – Equação do modelo de Higuchi.	145
Tabela 41 – Significância estatística entre a quantidade acumulada de DXM encontradas no estrato córneo e pele remanescente (n=6) das formulações avaliadas.	149
Tabela 42 – Teste ANOVA um critério (penetração de DXM no EC) seguido de teste t entre os grupos avaliados.	184
Tabela 43 – Teste ANOVA um critério (penetração de DXM na pele remanescente) seguido de teste t entre os grupos avaliados.	186

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados	20
2.1.1	Classificação	24
2.1.2	Vantagens e desvantagens	25
2.1.3	Metodologias de preparação	27
2.1.3.1	Homogeneização sob alta pressão à quente	27
2.1.3.2	Homogeneização à frio	30
2.1.3.3	Emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente	30
2.1.3.4	A partir de microemulsão	32
2.1.3.5	Fluido super crítico	34
2.1.3.6	Emulsão dupla ou múltipla	35
2.1.3.7	Emulsificação-ultrassom	37
2.1.4	Utilização para uso tópico	38
2.1.5	Produtos disponíveis no mercado farmacêutico	42
2.2	Óleo de pracaxi	43
2.3	Cera de carnaúba	47
2.4	Dexametasona	50
2.5	Pele e permeabilidade cutânea	53
2.6	Modelos de penetração e/ou permeação cutânea <i>in vitro</i>	56
2.7	Planejamento experimental	59
2.7.1	Planejamento fatorial fracionado	63
2.7.2	Planejamento composto central	66
3	OBJETIVOS	71
3.1	Objetivo geral	71
3.2	Objetivos específicos	71
4	MATERIAL E MÉTODOS	72
4.1	Material	72
4.2	Equipamentos e acessórios	72
4.3	Métodos	74
4.3.1	Caracterização físico-química do óleo de pracaxi	74
4.3.1.1	Composição de ácidos graxos	74
4.3.1.2	Densidade, viscosidade dinâmica e cinemática	74
4.3.1.3	Determinação do EHL requerido para o óleo de pracaxi em emulsões com Tween® 80 e Span® 60	75

4.3.1.3.1	Análise macroscópica e índice de cremagem	76
4.3.1.3.2	Análise de pH	76
4.3.1.3.3	Avaliação da estabilidade preliminar	77
4.3.1.4	Diagrama de fases pseudoternário	77
4.3.2	Avaliação físico-química de misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi	79
4.3.2.1	Análise térmica por DSC	79
4.3.2.2	Difração de raios-X	79
4.3.3	Seleção da proporção de tensoativos utilizados na formulação de CLN	79
4.3.4	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	80
4.3.4.1	Planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2}	80
4.3.4.2	Planejamento composto central	81
4.3.5	Metodologia analítica para quantificação da dexametasona	82
4.3.5.1	Validação do método analítico	85
4.3.5.1.1	Seletividade	86
4.3.5.1.2	Linearidade	89
4.3.5.1.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	90
4.3.5.1.4	Precisão	90
4.3.5.1.5	Exatidão	90
4.3.5.1.6	Robustez	91
4.3.6	Solubilidade da DXM em óleo de pracaxi	91
4.3.7	Coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi e água	92
4.3.8	Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados	93
4.3.8.1	Determinação de tamanho médio e índice de polidispersão (PDI)	93
4.3.8.2	Eficiência de incorporação de fármaco	94
4.3.8.3	Microscopia eletrônica de transmissão	94
4.3.9	Secagem dos CLN por liofilização	95
4.3.9.1	Preparação das formulações utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i>	95
4.3.10	Liberação <i>in vitro</i> da DXM	96
4.3.11	Penetração e/ou permeação cutânea <i>in vitro</i>	99
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1	Caracterização físico-química do óleo de pracaxi	101
5.1.1	Composição de ácidos graxos	101
5.1.2	Determinação de densidade, viscosidade dinâmica e cinemática.	104
5.1.3	Determinação do EHL requerido	109
5.1.4	Diagrama de fases pseudoternário	112
5.2	Avaliação da mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi	115
5.2.1	Análise térmica por DSC	115
5.2.2	Difração de raios-X	118

5.3	Metodologia analítica para quantificação da dexametasona	120
5.3.1	Validação do método analítico	122
5.3.1.1	Seletividade	122
5.3.1.2	Linearidade	123
5.3.1.3	Limites de detecção e quantificação	123
5.3.1.4	Precisão	125
5.3.1.5	Exatidão	125
5.3.1.6	Robustez	126
5.4	Solubilidade da DXM em óleo de pracaxi	126
5.5	Partição da DXM em óleo de pracaxi e água	127
5.6	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	128
5.6.1	Seleção da proporção de tensoativos utilizados na formulação de CLN	129
5.6.2	Planejamento experimental fracionado de resolução IV	129
5.6.3	Planejamento composto central	136
5.6.4	Microscopia eletrônica de transmissão	142
5.7	Liberação <i>in vitro</i> da DXM	142
5.8	Penetração/permeação <i>in vitro</i> da DXM	147
6	CONCLUSÃO	152
	REFERÊNCIAS	154
	APÊNDICES	183
	APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIFERENÇA DE CON- CENTRAÇÃO DE DXM NO EC ENTRE OS AS FOR- MULAÇÕES AVALIADAS	184
	APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIFERENÇA DE CON- CENTRAÇÃO DE DXM NA PELE REMANESCENTE ENTRE OS AS FORMULAÇÕES AVALIADAS	186
	APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS REFERENTES À AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE	188

1 INTRODUÇÃO

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são sistemas coloidais constituídos por uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, constituída pela mistura de um lipídio sólido (cera) e um líquido (óleo), dispersa em um meio aquoso estabilizado por tensoativos (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Atualmente, os CLN despertam o interesse dos setores alimentício, farmacêutico e cosmético. Principalmente por causa da versatilidade que sistemas nanoestruturados de constituição lipídica podem apresentar. Dentre as qualidades apresentadas estão: liberação controlada, liberação alvo-específica, aumento da estabilidade de fármacos incorporados na matriz lipídica, alta eficiência de incorporação de fármaco, possibilidade de transporte de substâncias tanto hidrofílicas como lipofílicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixa alergenicidade, baixa irritabilidade, não utilização de solventes orgânicos durante a preparação, facilidade de transposição da produção para escala industrial, possibilidade de esterilização e baixo custo de produção (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012).

A metodologia selecionada para ser utilizada neste trabalho foi a de homogeneização a alta pressão (HAP), desenvolvida inicialmente por Lucks e Müller (1996). A HAP, amplamente utilizada na indústria farmacêutica e cosmética, apresenta distribuição de tamanho uniforme das nanopartículas, ausência de contaminação por metal oriundo da sonda de ultrassom e facilidade de sobreposição para produção em larga escala (*scale-up*) como algumas vantagens que a torna atrativa para a preparação de CLN, principalmente frente a outros métodos que utilizam agitação mecânica e ultrassom (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001; BATTAGLIA et al., 2014; SHEGOKAR; SINGH; MÜLLER, 2011).

A matriz lipídica de CLN é constituída, na maioria das vezes, por lipídios sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis como, por exemplo, Compritol[®] ATO 888 e Mygliol[®] 812 (TAMJIDI et al., 2013). No entanto, a utilização de lipídios naturais, como alternativa aos lipídios sintéticos, está sendo estudada por diversos autores (NICULAE et al., 2014; MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; AVERINA; SEEWALD, 2010).

Dentre os motivos da busca por matérias-primas de origem natural, pode-se citar a preocupação da sociedade por produtos manufaturados ecologicamente corretos. Além disto, a viabilidade econômica de insumos extraídos da natureza de forma sustentável pode ser alcançada com o desenvolvimento tecnológico e a utilização destas matérias primas em produtos com alto valor agregado.

Neste contexto, este trabalho tem como uma de suas propostas a utilização de lipídios de origem natural (cera de carnaúba e óleo de pracaxi) para preparação de CLN como forma de promover inovação tecnológica e uma nova aplicação destes insumos na área farmacêutica e/ou cosmética.

A cera de carnaúba e o óleo de pracaxi são oriundos das regiões nordeste e amazônica, respectivamente. No cenário econômico, apresentam relevância nas suas regiões de produção,

pois são usados como matéria-prima em diversos setores, entre eles, o farmacêutico e cosmético (CARVALHO, 2005; BARATA, 2005). No entanto, não há relatos na literatura da combinação desses lipídios para obtenção de CLN.

Os grupos de pesquisa, que atuam no desenvolvimento de formulações para administração por via tópica, demonstram grande interesse em formulações contendo CLN. Principalmente por causa das características de aumento da concentração de fármaco no local de ação e o aumento da eficácia terapêutica dos fármacos incorporados nestes sistemas (KUNTSCHE et al., 2008; SANTOS MAIA et al., 2002; CLARES et al., 2014; PATHAK; NAGARSENKER, 2009).

As características citadas são desejáveis no tratamento de sintomas de inflamações cutâneas, que são realizados, de forma geral, por meio da aplicação tópica de fármacos glicocorticóides, como por exemplo, a dexametasona (DXM) (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008).

Wiedersberg, Leopold e Guy (2008) relataram que o veículo utilizado apresenta grande influência na penetração de glicocorticóides tópicos nas camadas da pele e, conseqüentemente, a biodisponibilidade e potencia dos mesmos. O efeito oclusivo, promovido pelo uso de veículos oleosos (pomadas), foi apontado como um dos responsáveis pelo aumento da penetração nas camadas da pele, pois a oclusão do tecido cutâneo provoca o aumento da hidratação do estrato córneo, que facilita a absorção cutânea do fármaco.

O efeito oclusivo é uma das principais características apresentadas por CLN, por isso são candidatos promissores para a administração de glicocorticóides tópicos (LOO; BASRI; ISMAIL, 2013; HAMISHEHKAR et al., ; WISSING; LIPPACHER; MÜLLER, 2001).

Fundamentado na literatura e nas informações apresentadas até o momento, este trabalho propõe a utilização de lipídios de origem natural (cera de carnaúba e óleo de pracaxi) para a preparação de CLN, contendo o fármaco modelo dexametasona, e realizar a aplicação deste sistema de liberação por via tópica.

Esta tese apresenta um levantamento bibliográfico do estado da arte sobre CLN abordando aspectos como: conceitos, classificações, vantagens e desvantagens, metodologias de preparação e caracterização, aplicações em uso tópico e relata alguns produtos disponíveis no mercado contendo CLN. Ainda no levantamento bibliográfico, há uma abordagem sobre o óleo de pracaxi, cera de carnaúba e a dexametasona. Por ultimo, fez-se uma breve revisão sobre planejamentos experimentais do tipo fracionado e composto central.

A primeira etapa experimental deste trabalho consistiu na verificação da possibilidade da utilização da cera de carnaúba e o óleo de pracaxi para obtenção de CLN por meio de caracterização físico-química do óleo de pracaxi, da cera de carnaúba e das misturas físicas de cera e óleo. Na segunda etapa, foram realizados planejamentos experimentais do tipo fatorial fracionado e composto central com o intuito de se obter uma formulação de CLN com tamanho de partícula em torno de 200 nm, índice de polidispersão (PDI) menor

que 0,4 e maior eficiência de incorporação de DXM possível. Na última etapa, avaliou-se a liberação *in vitro* da DXM em sistema de difusão vertical composto por células de Franz com membrana de acetato de celulose e a penetração e/ou permeação *in vitro* em pele de orelha de porco da formulação selecionada na etapa anterior.

2 Revisão de literatura

2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados são sistemas coloidais, apresentados à comunidade científica no final da década de 1990, constituídos por lipídios sólidos estabilizados por tensoativos, que se propõem como alternativas a sistemas de liberação atuais, como por exemplo, emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (GASCO, 1993; GASCO, 1997; ALMEIDA; RUNGE; MÜLLER, 1997; ASAWALE; MESHARAM; KUMBHAR, 2014).

As nanopartículas lipídicas são divididas em dois tipos: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreados lipídicos nanoestruturados (CLN). As NLS são semelhantes as emulsões do tipo óleo/água com a diferença que a fase interna é composta por um lipídio sólido à temperatura ambiente, enquanto que nas emulsões O/A é composta por um lipídio líquido à temperatura ambiente.

Os CLN apresentam a matriz lipídica composta pela mistura de um lipídio sólido (cera) e um líquido (óleo), sendo que tal mistura deve se homogênea e sólida até a temperatura mínima de 40°C para garantir que não ocorra fusão dos lipídios em temperatura ambiente e também corporal (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER et al., 2007; MEHANNA; MOTAWAA; SAMAHA., 2012; GASCO, 2007).

Os CLN apresentam algumas vantagens frente as NLS, por exemplo: maior eficiência de incorporação de fármaco, menor liberação de fármaco da matriz lipídica durante o tempo de armazenamento e menor quantidade de água necessária nas dispersões (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012).

A composição da matriz lipídica de CLN pode ser de lipídios naturais ou sintéticos biodegradáveis, podendo alcançar a concentração de até 40% na formulação (PATIDAR et al., 2010).

A alta concentração lipídica pode conceder aparência semi-sólida para as preparações de CLN e são destinadas para produtos cosméticos como batons, por exemplo. Entretanto, concentrações lipídicas no intervalo entre 10% e 15% são favoráveis para utilização por via tópica, pois apresentam aparência fluida e, com isso, são facilmente dispersos em soluções aquosas ou incorporados em creme ou gel (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

A seleção dos componentes da mistura lipídica para preparação de CLN é determinante para o sucesso da formulação, principalmente, no que diz respeito às características físico-químicas que influenciam na estabilidade da preparação, na eficiência de incorporação de fármaco e na proteção contra degradação de fármacos sensíveis a agentes externos (oxidação, hidrólise) (TAMJIDI et al., 2013).

Algumas questões devem ser avaliadas para a seleção dos constituintes da mistura lipídica (lipídio sólido e líquido) a ser utilizada na preparação de CLN, entre elas estão:

solubilidade do fármaco nos lipídios, tamanho e conformação das cadeias lipídicas, estabilidade contra degradação (oxidação, lipólise), biodegradabilidade e biocompatibilidade (TAMJIDI et al., 2013).

A solubilidade do fármaco na mistura lipídica está intimamente ligada a eficiência de incorporação do mesmo pelas nanopartículas. Durante a seleção dos constituintes lipídicos do CLN deve-se dar preferência aos lipídios que apresentam maior afinidade pelo fármaco de escolha.

Quanto à conformação e tamanho das cadeias lipídicas, deve-se buscar os lipídios sólidos e líquidos com tamanhos e conformações de cadeias lipídicas com natureza mais heterogênea possível entre si com o objetivo de obter uma mistura lipídica com maior grau de desorganização possível da matriz lipídica (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

A proporção de lipídio líquido na mistura (lipídio sólido + lipídio líquido) também deve ser avaliada, pois elevadas concentrações de lipídio líquido podem provocar a saturação do mesmo no momento da solidificação da mistura, ocorrendo assim, o extravasamento de lipídio líquido a partir da mistura sólida. Por isso, deve-se verificar se a mistura formada pelo lipídio sólido e lipídio líquido é homogênea.

Experimentos simples com a utilização de papel filtro hidrofílico ou análise térmica por DSC podem ser usados para determinar a homogeneidade da mistura lipídica sólida (KASONGO et al., 2011).

Normalmente, são utilizados mono, di e triglicerídeos, ácidos graxos e ceras como constituintes lipídicos de NLS e CLN. Os lipídios líquidos comumente utilizados para preparação de CLN são: óleo de soja, óleo de milho, triglicerídeos de cadeia média (TCM), ácido oleico.

Os TCM são muito utilizados pois apresentam baixa viscosidade (28-32 mPa/s a 20°C), propriedades emulsificantes e estabilidade frente a oxidação. O ácido oleico apresenta também baixa viscosidade e propriedade emulsificante, no entanto, é mais suscetível a oxidação em comparação a TCM.

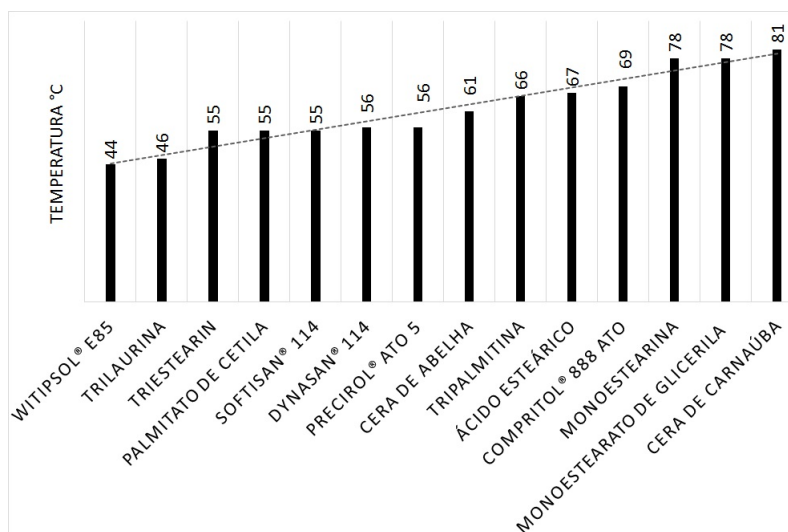
Os óleos de origem vegetal apresentam composição com maior variedade de triglicerídeos e ácidos graxos, alguns apresentam em sua composição substâncias com propriedades anti-oxidantes e têm custo financeiro menor que os TCM e o ácido oleico, por exemplo.

Alguns lipídios sólidos utilizados na preparação de NLS e CLN e suas respectivas temperaturas de fusão estão apresentadas na Figura 1.

Entre os lipídios sólidos, os mais utilizados para preparação de CLN são o monestearato de glicerila, behenato de glicerila (Compitrol[®] ATO 888) e o palmitato de cetila (TAMJIDI et al., 2013).

O Compitrol[®] ATO 888, produzido pela empresa francesa Gattefossé[®], consiste de mono (12-18 %) di (52-54 %) e triglicerídeos (28-32 %) do ácido behênico. Outros ácidos graxos, de cadeia menor, correspondem a menos de 15 %. É usado amplamente em cosméticos, alimentos e em formas farmacêuticas de uso oral.

Figura 1 – Gráfico com a temperatura de fusão de lipídios sólidos comumente utilizados para preparação de CLN.



Fonte: Adaptado de (SOUZA et al., 2011; ZHANG et al., 2011; RICCI et al., 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008; BHASKAR et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; LIU et al., 2008; LIU; WU, 2010; HAN et al., 2008; PATHAK; NAGARSENKER, 2009; NGUYEN et al., 2012; NAM; JI; PARK, 2011; PARDEIKE et al., 2011).

Diversos autores atribuem ao Compitrol® ATO 888 alta eficiência de incorporação de fármaco e boa estabilidade de formulações de CLN. A alta eficiência é atribuída a composição lipídica que produz uma matriz com várias imperfeições na estrutura cristalina, que contribui para o aumento da eficiência de incorporação (SOUTO; MEHNERT; MÜLLER, 2006; CASTRO et al., 2007; JENNING; MÄDER; GOHLA, 2000).

O monoestearato de glicerila é amplamente utilizado em formulações cosméticas, na indústria alimentícia e em formulações farmacêuticas. É classificado como não-tóxico e não-irritante (LUO et al., 2006).

As ceras de origem natural, como por exemplo, cera de carnaúba e de abelha são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para utilização em alimentos, e conseqüentemente, podem ser utilizadas para a preparação de CLN (TAN et al., 2014; LACERDA; CERIZE; RÉ, 2011).

A maioria das formulações de CLN são estabilizadas por meio de tensoativos. Em alguns casos, com menor ocorrência, são estabilizadas por uma combinação de tensoativos e biopolímeros.

A razão pelo uso expressivo de tensoativos como estabilizantes de CLN está na capacidade dos mesmos em formar espontaneamente nanoemulsões em métodos que empregam baixa energia e também a agilidade em adsorver na superfície das gotículas de fase interna e reduzir a tensão interfacial em métodos que empregam alta energia, como por exemplo, o método de homogeneização a alta pressão (TAMJIDI et al., 2013).

Preferencialmente, utiliza-se uma mistura de tensoativos em preparações de CLN.

A mistura é composta por dois tensoativos, um hidrofílico e outro lipofílico. Esta estratégia promove maior estabilidade à dispersão de nanopartículas em comparação ao uso de um tensoativo isolado (TAMJIDI et al., 2013; MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Além da utilização de mais de um tensoativo, é importante também, para a estabilidade dos CLN, a determinação do EHL requerido para a mistura lipídica e a utilização da proporção de tensoativos com o EHL adequado (KIM et al., 2014).

Os tensoativos não iônicos promovem a estabilização da dispersão de CLN através de efeito estérico. Os CLN preparados com este tipo tensoativo possuem resistência a mudanças de pH e concentração de eletrólitos, além de apresentar menor toxicidade e potencial de irritação quando comparados com tensoativos iônicos (TAMJIDI et al., 2013; ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012).

Os tensoativos mais utilizados são: os Tweens[®], como por exemplo, o Tween[®] 80, fosfolipídios e os Poloxamers[®], como por exemplo, o Poloxamer[®] 188 (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). O Tween[®] 80 é um tensoativo hidrossolúvel do tipo não iônico com valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 15. É adequado para estabilização de dispersões de CLN e apresenta a vantagem de manter a dispersão estável em casos de mudanças de pH e alterações de concentração de eletrólitos no meio (TAMJIDI et al., 2013).

O Poloxamer[®] 188 é um tensoativo do tipo não-iônico com EHL em torno de 29. Apresenta vantagens como: estabilidade à altas temperaturas, baixa toxicidade e concede boa estabilidade à formulações de CLN, evitando a agregação das nanopartículas (TAMJIDI et al., 2013; HAN et al., 2008).

Os fosfolipídios são moléculas hidrofóbicas com EHL em torno de 8-9 (OHYAMA, 1990). Possuem classificação GRAS (*Generally Recognized As Safe*), expedida pelo FDA (*U.S Food and Drug Administration*), e são encontradas no mercado com vários níveis de purificação, devido a isto, a variação em suas características, como por exemplo EHL, é diversificada. Possuem altas concentrações de ácidos graxos insaturados, principalmente as obtidas da soja, e por isso, são suscetíveis à oxidação (TAMJIDI et al., 2013). São utilizadas em associação com outros tensoativos, pois de forma isolada não são adequadas para estabilizar dispersões de CLN (DOKTOROVÁ et al., 2010; LIU et al., 2007; ZHUANG et al., 2010; CHEN et al., 2006).

O emprego de biopolímeros para a preparação de CLN é menos frequente porque as suas características podem ser alteradas devido a utilização de alta temperatura durante o processo de preparação, principalmente, se o método de homogeneização a alta pressão a quente for aplicado, pois submete os constituintes da formulação ao aquecimento (TAMJIDI et al., 2013).

Uma alternativa é a associação de biopolímeros e tensoativos. A utilização de pequenas quantidades de tensoativos em conjunto com biopolímeros proporciona o aumento da eficiência de emulsificação da mistura devido a intensa interação entre o tensoativo e o

polímero (ZHENG et al., 2013).

Liu, Wang e Xia (2012) utilizaram como tensoativos, para preparação de CLN, uma molécula obtida por meio da modificação do biopolímero goma arábica associada a um tensoativo derivado do ácido láurico e lecitina obtida da soja. A metodologia utilizada para preparação foi a homogeneização a alta pressão a quente, sob temperatura de 55 °C.

A associação de um tensoativo ao biopolímero e a temperatura relativamente baixa (55 °C) não afetou o desempenho dos tensoativos, que foram capazes de estabilizar a formulação por um período de 3 meses. Além disso, a molécula incorporada no CLN (coenzima Q-10) apresentou aumento de 200% na biodisponibilidade.

Os tensoativos utilizados para preparação de CLN devem ser selecionados com critério e observando a via de administração pretendida, uma vez que há limitações quanto a biocompatibilidade de alguns tensoativos (JOSHI; MÜLLER, 2009).

Para via tópica esta limitação é menor, no entanto, deve-se evitar a utilização de tensoativos que apresentam possibilidade de causar irritação na pele (WILHELM; FREITAG; WOLFF, 1994).

2.1.1 Classificação

A classificação dos CLN está baseada, principalmente, na forma com que a matriz lipídica se organiza durante o processo de preparação.

Sabe-se que esta organização exerce grande influência na capacidade de incorporação de fármaco na matriz e também na manutenção do aprisionamento deste durante o período de armazenamento. Os CLNs são classificados em três tipos: matriz imperfeita (tipo I), matriz amorfa (tipo II) e matriz múltipla (tipo III) (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

O tipo I, também denominado matriz lipídica sólida imperfeita, apresenta uma estrutura altamente desorganizada, devido a mistura do lipídio líquido (óleo) ao lipídio sólido (cera) fundido. Essa mistura ao solidificar e, conseqüentemente, recristalizar apresentará uma estrutura que fornece espaços vazios para acomodar o fármaco na matriz lipídica.

Os espaços são obtidos devido a conformação espacial heterogênea apresentada pelos triglicerídeos formados por diferentes ácidos graxos, como também pela presença de insaturações (TAMJIDI et al., 2013).

O tipo II ou matriz lipídica amorfa, é obtida quando a matriz lipídica encontra-se no estado amorfo. Neste tipo de organização da matriz, os lipídios foram misturados de uma forma que se evitou a cristalização durante o resfriamento da mistura.

O tipo III ou CLN múltiplo, apresenta fase múltipla do tipo lipídio líquido/lipídio sólido/água e o fármaco pode estar solubilizado no lipídio sólido ou líquido, apresentando normalmente maior afinidade pelo lipídio líquido.

Este tipo de CLN é obtido em ocasiões onde se utiliza alta concentração de óleo na composição da matriz lipídica, que causa a saturação do óleo na mistura lipídica e a

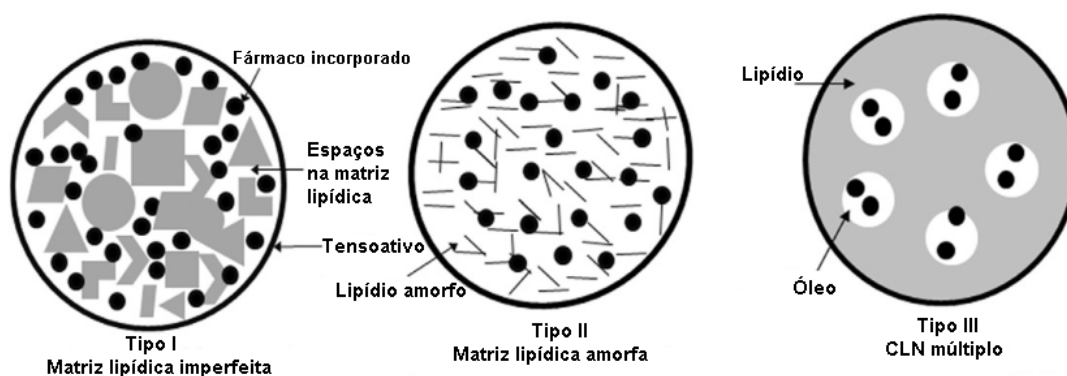
ocorrência de separação do mesmo durante o processo de solidificação (recristalização), provocando a separação das fases (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b; JENNING; MÄDER; GOHLA, 2000).

Isto ocasiona a formação de pequenos compartimentos de óleo na matriz lipídica. Nestes compartimentos líquidos o fármaco está em maior concentração, devido a maior afinidade por esta fase. Essa característica confere a este tipo de CLN maior capacidade de incorporação de fármaco.

A porção líquida deste tipo de CLN está circundada por lipídio sólido, isso faz com que haja liberação controlada do fármaco e evita também expulsão do mesmo (TAMJIDI et al., 2013).

A Figura 2 apresenta uma ilustração com a classificação dos carreadores lipídicos nanoestruturados apresentando as diferentes formas com que a matriz lipídica se organiza em cada tipo de CLN.

Figura 2 – Ilustração com a classificação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.



Fonte: adaptado de (TAMJIDI et al., 2013).

2.1.2 Vantagens e desvantagens

As vantagens das nanopartículas lipídicas, de forma abrangente, são: liberação controlada e alvo-específica de fármacos, aumento da estabilidade de fármacos facilmente degradáveis, alta eficiência de incorporação, possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, utilização de lipídios biodegradáveis e de alta biocompatibilidade, fácil implementação de produção em larga escala, possibilidade de esterilização da formulação e menor custo financeiro quando comparado a preparação poliméricas (PATIDAR et al., 2010).

Especificamente sobre os CLN, além das vantagens atribuídas a todas as nanopartículas lipídicas, eles apresentam características exclusivas que dão vantagem sobre os demais sistemas de liberação de fármacos.

Os CLN apresentam efeito oclusivo e hidratação devido a afinidade com a pele e o tamanho reduzido das partículas, que formam uma camada de oclusão no tecido cutâneo que evita a perda de água e conseqüentemente promove hidratação (SAMEIN, 2014).

Este efeito oclusivo e de hidratação auxilia também na maior penetração do fármaco nas camadas da pele. Foi atribuído aos CLNs também, maior penetração do fármaco em tecidos cutâneos em comparação com as formulações convencionais (SAMEIN, 2014).

As vantagens dos CLNs sobre as NLS estão relacionadas com a possibilidade de minimizar ou evitar alguns dos problemas apresentados pelas NLS. Entre esses problemas, os principais são: expulsão do fármaco incorporado durante o tempo de armazenamento e baixo teor de fármaco incorporado (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

As NLS apresentam estes problemas por causa da sua composição de lipídios com cadeias de tamanho semelhante, que resulta em uma matriz lipídica com alto grau de organização e que possui poucas imperfeições na matriz.

O fármaco incorporado encontra-se entre as cadeias de ácidos graxos destes lipídios ou nos espaços fornecidos pela imperfeições formadas durante a cristalização da matriz lipídica do CLN.

A cristalização durante o processo de solidificação, dá origem a estruturas cristalinas de alta energia do tipo β' e α e, durante o tempo de armazenamento, estas estruturas cristalinas se transformam na forma β , de menor energia.

A forma β possui maior organização e menos imperfeições, sendo assim, durante a transformação das formas β' e α para β , o fármaco incorporado nestes espaços fornecidos pelas imperfeições das formas cristalinas e entre as cadeias de ácidos graxos é expulso para fora da matriz lipídica (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

Os CLN possuem composição lipídica de lipídios líquidos e sólidos à temperatura ambiente. A mistura destes lipídios, com composição de cadeias lipídicas de tamanhos diferentes, promove menor grau de organização da matriz lipídica do CLN durante a preparação. O menor grau de organização da matriz evita ou retarda a transformação das formas β' e α em β . Por isso, a expulsão de fármaco durante o tempo de armazenamento é ausente ou diminuída em CLN. A menor organização da matriz lipídica do CLN é responsável também pela maior quantidade de fármaco incorporado quando se compara CLN e NLS. A matriz lipídica do CLN apresenta maior número de imperfeições na estrutura cristalina da matriz lipídica e essas imperfeições fornecem espaços para incorporar o fármaco na matriz. Devido o CLN apresentar menor organização das cadeias lipídicas, e conseqüentemente mais imperfeições, a quantidade de fármaco incorporado é maior quando comparado a NLS (TAMJIDI et al., 2014).

O que provoca menor grau de organização do CLN, quando comparado a NLS, é a diversidade de composição lipídica, que apresenta cadeias carbônicas de tamanhos e conformações estruturais diferentes entre os lipídios sólido e líquido utilizados na preparação de CLN (HU et al., 2006).

Entre as desvantagens apresentadas por CLNs, estão: a grande quantidade de água nas dispersões, cerca de 70 % a 95 %, e a possibilidade de coexistência de outras estruturas coloidais na dispersão como, por exemplo, tensoativos na forma de micelas. A grande quantidade de água na dispersão de NLS e CLN (70-95 %) pode provocar a degradação do fármaco por reações de hidrólise, por exemplo. As alternativas para contornar esta desvantagem são: secagem por liofilização e *spray drier* (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012).

O tensoativo em excesso pode formar espontaneamente micelas ou outras estruturas vesiculares na fase aquosa. Com isso, o fármaco não incorporado no CLN pode encontrar-se solubilizado nessas estruturas coloidais formadas, resultando em modificação do perfil de liberação como também na eficiência de incorporação das nanopartículas (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012).

Outras desvantagens estão associadas a determinadas metodologias de preparo, a cristalização do lipídio, a forma de incorporação do fármaco na matriz lipídica e a baixa viscosidade da dispersão de nanopartículas lipídicas. A última podendo ser corrigida com a incorporação da dispersão de CLN em emulsões ou hidrogéis (YADAV et al., 2013).

2.1.3 Metodologias de preparação

2.1.3.1 Homogeneização sob alta pressão à quente

Esta metodologia é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, e esta estabelecida principalmente na produção de emulsões para nutrição parenteral. Alguns exemplos de produtos disponíveis no mercado que utilizam esta metodologia são: Intralipid[®], Lipofundin[®] e Lipovenoes[®] (HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010).

Baseada nesta metodologia utilizada para preparação de nanoemulsões, em 1991 Lucks e Müller (1996) patenteou o processo de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) usando os fundamentos da metodologia de preparação de nanoemulsões com o uso de homogeneizador a alta pressão. A técnica de homogeneização sob alta pressão (HAP) à quente é realizada em temperatura acima da ocorrência de fusão dos lipídios constituintes da nanopartícula lipídica. Sendo assim, os lipídios estarão no estado líquido durante o processo de homogeneização a alta pressão. A HAP à quente é indicada quando se deseja incorporar fármacos lipofílicos e que não sejam sensíveis à temperatura. O uso de HAP à quente não apresenta eficiência satisfatória para incorporação de fármacos hidrossolúveis, pois durante o processo de homogeneização à quente pode ocorrer partição do fármaco no sentido da fase aquosa. Isto provoca diminuição da eficiência de incorporação (TAMJIDI et al., 2013). No caso de fármacos hidrossolúveis, a metodologia de HAP à frio é mais adequada (KAMBLE et al., 2012).

Na metodologia de HAP para preparação de CLN, uma pré-emulsão é obtida dispersando a fase oleosa composta pelos lipídios fundidos a uma temperatura em torno de

10 °C acima da fusão e a fase aquosa composta por água e tensoativos na mesma temperatura. As duas fases são dispersas em um dispositivo de alto cisalhamento, como por exemplo, Ultraturrax[®]. Esta etapa consiste na dispersão de dois componentes imiscíveis que formam uma interface entre si (pré-emulsão) e requer o emprego de energia para dispersão da fase interna em pequenas gotículas. A energia empregada durante a emulsificação proporciona aumento da área interfacial entre as fases interna e externa devido a formação das gotículas de óleo de tamanho reduzido e o aumento do número das mesmas. Os tensoativos presentes na fase aquosa irão se dispor na interface entre as duas fases, promovendo a estabilização da pré-emulsão (TADROS, 2009).

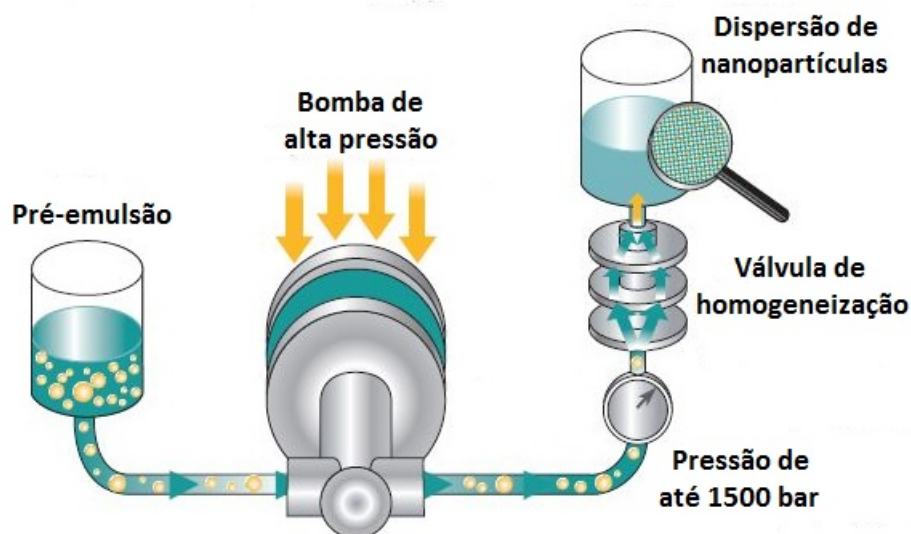
Em seguida, a pré-emulsão é levada ao homogeneizador de alta pressão (HAP) onde é submetida a ciclos de homogeneização que variam, geralmente, entre 1 a 10 e sob pressão que também varia entre 100 a 1500 bar. Durante os ciclos de homogeneização a pré-emulsão é submetida a forças de cisalhamento, cavitação e turbulência por meio da passagem da pré-emulsão por uma válvula de homogeneização. Esta válvula promove a passagem da dispersão por um orifício com diâmetro micrométrico. Antes da válvula, o fluido encontra-se sob alta pressão (até 1500 bar) e baixa velocidade. Ao atravessar, adquire grande energia cinética (velocidade) em um curto espaço e sofre uma queda brusca e intensa na pressão, que era de até 1500 bar e cai para pressão atmosférica. Esse processo dinâmico pelo qual o fluido é submetido provoca intensas mudanças de energia, que explicam os fenômenos de cisalhamento, cavitação e turbulência pelos quais são submetidos durante a homogeneização a alta pressão (FLOURY et al., 2004).

A Figura 3 apresenta a descrição esquemática do processo de homogeneização a alta pressão.

O uso de equipamentos que proporcionam alto cisalhamento, como o Ultraturrax[®], entregam energia suficiente à dispersão para a diminuição das gotículas de óleo, no entanto não se obtém nanopartículas somente na escala nanométrica, ocorrendo também a presença de partículas maiores (alta polidispersão). Para se obter gotículas de dimensão nanométrica com polidispersão adequada é necessário o uso de técnicas que empregam maior quantidade de energia ao sistema, como por exemplo, homogeneizadores de alta pressão (TADROS, 2009).

Para que uma gotícula de óleo tenha seu tamanho reduzido, deve-se submetê-la a um stress que provoque a sua deformação e posterior divisão em gotículas menores. Quanto menor o raio, maior o stress necessário para ocorrer a deformação e a divisão em gotículas menores. Durante a etapa de pré-emulsão e utilização de Ultraturrax[®], este stress é transmitido para as gotículas pela agitação do líquido da fase externa, e quanto maior a agitação, maior a energia empregada. A dificuldade em diminuir o tamanho das gotículas de óleo da fase interna de uma emulsão para a escala nanométrica é explicada

Figura 3 – Descrição esquemática do método de homogeneização a alta pressão.



Fonte: adaptado de <http://www.particlesciences.com/images/tb/emulsification-process-using-a-high-pressure-homogenizer.jpg>

pela equação de pressão de Laplace, Equação 2.1.

$$\Delta P = 2\gamma/r \quad (2.1)$$

Esta equação demonstra a diferença de pressão existente entre o interior e o exterior de uma superfície curvada, uma gotícula de óleo de uma emulsão por exemplo. Onde, ΔP é a diferença de pressão entre o interior e o exterior da gotícula, γ é a tensão interfacial e R é o raio da gotícula. Esta diferença de pressão é proporcionada pela tensão interfacial entre dois meios imiscíveis, ou seja, a fase interna e externa da emulsão. O interior da gotícula apresenta pressão maior que o exterior, e quanto menor for a gotícula maior será a diferença de pressão entre a interface interna e externa. Consequentemente, quanto menor for a gotícula da fase interna maior será a resistência à ruptura em gotículas menores (CANSELIER; POUX, 2004).

A energia empregada durante as etapas de pré-emulsão e homogeneização a alta pressão são suficientes para a formação de gotículas nanométricas, graças a diminuição da tensão interfacial das duas fases imiscíveis proporcionada pelo uso de tensoativos, como também, a diminuição da viscosidade da fase interna provocada pelo aumento de temperatura durante o processo de preparação (TADROS, 2009).

O resfriamento da emulsão após as etapas de pré-emulsão e homogeneização à alta pressão pode ocorrer à temperatura ambiente como também de forma brusca, através de banho de gelo ou diluição com água gelada (2–4 °C) (RICCI et al., 2005).

As dispersões de CLN obtidas pela técnica de HAP à quente apresentam partículas com distribuição de tamanho uniforme. Esta característica confere estabilidade satisfatória

das dispersões, que por serem um sistema instável apresentam tendência de agregação de coalescência das partículas (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

2.1.3.2 Homogeneização à frio

A homogeneização a frio é adequada em situações onde o fármaco é sensível à temperatura ou em situações em que a temperatura elevada, durante a etapa de pré-emulsão, pode provocar a partição do fármaco para a fase externa (hidrossolúvel).

Nesta técnica de preparação, a mistura lipídica é fundida e o fármaco solubilizado nesta mistura. Se a solubilidade do fármaco for insuficiente, pode-se utilizar tensoativos para promover a solubilização do fármaco na mistura lipídica utilizada. Posteriormente, a fase lipídica é resfriada para que se torne sólida e então é reduzida a escala micrométrica por meio de trituração. O resfriamento pode ser efetuado com auxílio de gelo seco ou nitrogênio (N_2) líquido para aumentar a fragilidade do sólido e facilitar a redução de tamanho. Em seguida, o sólido triturado, com tamanho na escala micrométrica, é disperso na fase aquosa contendo tensoativos em temperatura ambiente ou menor. A pre-dispersão à frio obtida é submetida ao processo de HAP em temperatura ambiente ou menor ($0^\circ C$). A energia empregada pelo homogeneizador a alta pressão é suficiente para diminuir as micropartículas lipídicas da dispersão em partículas nanométricas (TAMJIDI et al., 2013; UNER, 2006; ALMEIDA; RUNGE; MÜLLER, 1997).

Durante as etapas de pré-dispersão e HAP, ambas a frio, o fármaco aprisionado na matriz lipídica sólida apresenta menor partição para a fase aquosa. Com isso, fármacos hidrossolúveis ou termolábeis podem ser incorporados em NLS ou CLN com maior eficiência se comparados com a técnica de HAP a quente (KASONGO; MÜLLER; WALKER, 2011).

2.1.3.3 Emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente

As metodologias de preparação de nanopartículas lipídicas por meio de emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente são de execução simplificada, não necessitam de equipamentos especiais de alto custo e podem ser facilmente realizadas em escala laboratorial. Esta metodologia foi utilizada originalmente no desenvolvimento de nanopartículas com polímeros sintéticos (HU et al., 2006; MARCATO, 2009).

Na metodologia de emulsificação-difusão de solvente, as nanopartículas lipídicas são preparadas a partir da difusão de solvente orgânico hidrossolúvel de uma emulsão do tipo O/A, levando a precipitação das nanopartículas lipídicas. A técnica consiste em uma fase oleosa composta pelos lipídios solubilizados em solvente orgânico miscível em água e a fase aquosa composta por água e tensoativos. As duas fases são dispersas para a obtenção de uma emulsão. Em seguida, ocorre a diluição em água da emulsão recém obtida, promovendo a precipitação dos lipídios por causa da difusão do solvente orgânico e, conseqüentemente, a formação da dispersão de nanopartículas lipídicas em meio aquoso (HU et al., 2002).

Hu et al. (2006) preparou NLS e CLN a partir de monoestearina ($C_{21}H_{42}O_4$) e triglicerídeos do ácido cáprico ($C_{10}H_{20}O_2$) e caprílico ($C_8H_{16}O_2$) solubilizados em partes iguais de acetona (C_3H_6O) e etanol (C_2H_6O) utilizando a metodologia de emulsificação-difusão de solvente. As nanopartículas foram preparadas a partir da obtenção de uma emulsão em banho maria a 50°C e posterior diluição em 120 mL de solução de PVA a 0,2% (p/v) em temperatura de 70°C e em 0°C . As nanopartículas que foram preparadas por meio da difusão do solvente em temperatura de 0°C apresentaram distribuição de tamanho bi-modal e índice de polidispersão de 0,35. Enquanto as submetidas a 70°C , apresentaram distribuição de tamanho mono-modal e diminuição estatisticamente significativa do índice de polidispersão quando comparada as nanopartículas submetidas a diluição em 0°C . Além da diferença no tamanho e PDI, o perfil de liberação também mudou, apresentando diferenças nas etapas de liberação rápida (*burst release*) e liberação controlada de acordo com a temperatura utilizada na etapa de difusão do solvente.

A emulsificação-evaporação de solvente consiste na evaporação do solvente contido na fase oleosa, provocando a precipitação das nanopartículas lipídicas em meio aquoso. O solvente orgânico é utilizado para dissolver os componentes lipídicos da fase oleosa e, então, a fase oleosa é dispersa em uma fase aquosa contendo tensoativos, que resulta na formação de uma emulsão. Em seguida, o solvente é evaporado sob agitação ou em banho maria sob pressão reduzida (rota- evaporador) (UNER, 2006).

Geralmente, utiliza-se etanol (C_2H_6O) como solvente dos constituintes da fase oleosa. No entanto, pode-se utilizar também solventes insolúveis em água, como diclorometano (CH_2Cl_2) (MARCATO, 2009). A utilização de solventes insolúveis em água está se tornando obsoleta, devido a toxicidade dos mesmos (BATTAGLIA et al., 2014).

Yadav et al. (2014) prepararam NLS constituídas de triestearina ($C_{57}H_{110}O_6$) com o fármaco fluconazol incorporado através da metodologia de emulsificação- evaporação de solvente. A emulsão de partida, contendo etanol como solvente orgânico para solubilizar os lipídios da fase oleosa, foi preparada a 60°C e a evaporação do solvente foi realizada sob agitação constante, em temperatura ambiente.

Hu et al. (2014) obtiveram NLS e CLN através de uma combinação dos métodos de evaporação e difusão de solvente, utilizando etanol (C_2H_6O) como solvente orgânico. Primeiro realizou-se a evaporação do solvente em banho maria (70°C) de uma emulsão com 20 mL de volume inicial até atingir 6 mL e, em seguida, promoveu-se a difusão do solvente contido nesta emulsão através da adição da mesma em 25 mL de solução gelada ($0-2^\circ\text{C}$) de Tween[®] a 1%, sob agitação constante. Segundo o autor, as nanopartículas lipídicas obtidas apresentaram estabilidade satisfatória e formato esférico.

Uma modificação da metodologia de emulsificação- evaporação de solvente, utiliza seringa e agulha para a introdução da fase oleosa na fase aquosa sob agitação constante. Stancampiano, Puglisi e Pignatello (2008) desenvolveram NLS carregadas com o fármaco naproxeno através da injeção de 5 mL de uma fase oleosa composta por uma solução

etanólica de ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) e o tensoativo Lipoid[®] S 100 em 30 mL de água bi-destilada sob agitação em Ultraturrax[®] a 13500 rpm. A evaporação do solvente foi promovida por agitação magnética durante 24 horas.

As nanopartículas preparadas pelos métodos de difusão e evaporação de solvente apresentam diluições de pequenas proporções, entre 1:5 e 1:10. Estas diluições com volumes relativamente pequenos são possíveis devido a baixa solubilidade dos lipídios nos solventes orgânicos utilizados (TAMJIDI et al., 2013). Devido esta baixa solubilidade é necessário, em alguns casos, o uso de aquecimento para completa solubilização do lipídio. A concentração lipídica das nanopartículas preparadas através dos métodos de difusão e evaporação de solvente podem chegar a até 15 % (UNER, 2006).

As nanopartículas obtidas por esta metodologia apresentam tamanho médio entre 30-100 nm. A variação no tamanho ocorre de acordo com parâmetros como: concentração lipídica, tipos e concentração de tensoativos e condições de preparo. Estas variáveis são responsáveis pelo tamanho da gotícula de fase interna formada durante a etapa de emulsificação.

Outro evento que promove a diminuição do tamanho da gotícula de fase interna é a evaporação do solvente. No entanto, este evento tem menor relevância porque de acordo com a Equação 2.2, onde R corresponde ao raio da esfera, para se diminuir o raio de uma esfera pela metade há a necessidade de evaporar 7/8 do seu volume inicial (TAMJIDI et al., 2013).

$$\text{Volume da esfera} = \frac{4 \cdot \pi \cdot R^3}{3} \quad (2.2)$$

Uma das vantagens deste método é não submeter a preparação a altas temperaturas. No entanto, como desvantagens podem-se citar a utilização de solvente orgânico, a dificuldade de *scale-up* e produção em larga escala (HU et al., 2006).

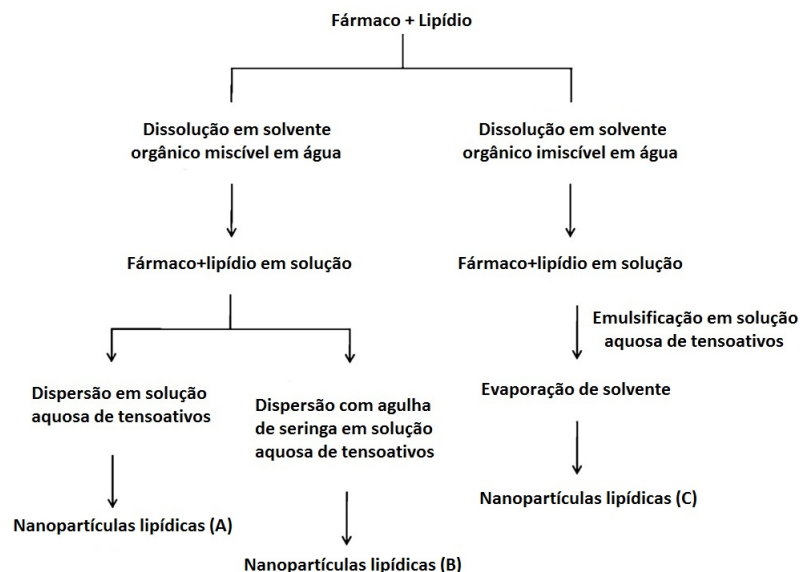
A Figura 4 apresenta a descrição esquemática das metodologias de emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente. Os esquemas (A) e (B) representam nanopartículas obtidas pelo método de emulsificação-difusão de solvente e (C) representa as nanopartículas lipídicas obtidas pelo método de emulsificação-evaporação de solvente.

2.1.3.4 A partir de microemulsão

Este método de preparação é baseado na diluição em água gelada, sob agitação constante, de uma microemulsão recém preparada (GASCO, 1993). O esquema descritivo da preparação de nanopartículas lipídicas a partir de microemulsão esta representado na Figura 5.

A microemulsão é obtida a partir de dispersão das fases aquosa contendo tensoativo e co-tensoativo e fase oleosa contendo fármaco de escolha e o lipídio(s), ambas em temperatura acima da ocorrência de fusão dos lipídios. Após a obtenção da microemulsão, é adicionado um solvente orgânico hidrossolúvel, por exemplo, acetona (C_3H_6O) ou butanol ($C_4H_{10}O$).

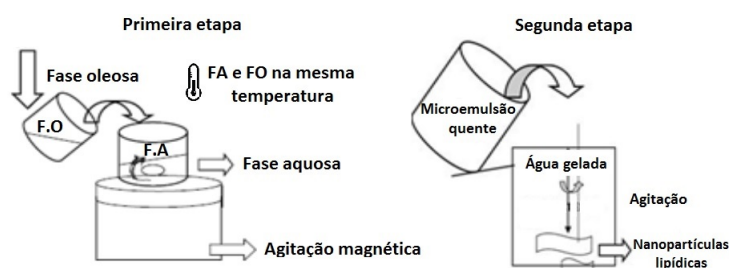
Figura 4 – Descrição esquemática dos métodos de emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente.



Fonte: adaptado de (YOON; PARK; YOON, 2013).

Esta microemulsão acrescida de solvente é então diluída, sob agitação, em água gelada (2-10°C) em uma proporção no intervalo entre 1:5 e 1:50. Durante a diluição com água gelada, ocorre a desestabilização da microemulsão e solidificação (recristalização) dos lipídios da fase interna da microemulsão e, conseqüentemente, a formação das nanopartículas lipídicas (GASCO, 1997; UNER, 2006).

Figura 5 – Descrição esquemática do método de microemulsão.



Fonte: adaptado de (TEJA; CHOWDARY; RAJU, 2014).

A desestabilização da microemulsão ocorre devido o rápido fluxo do solvente orgânico hidrossolúvel utilizado na preparação da microemulsão em direção a fase externa. Este fenômeno é semelhante ao que ocorre no método de preparação de nanopartículas poliméricas, onde ocorre a rápida diluição do solvente orgânico devido a adição de água, resultando na precipitação das nanopartículas poliméricas (KAMBLE et al., 2012).

Igartua et al. (2002) utilizaram butanol (C₄H₁₀O) 7,5% (p/p) como solvente

hidrofílico na preparação de nanopartículas lipídicas pelo método de microemulsão. A microemulsão constituída de fase oleosa composta por 5% de oleato de etila ($C_{20}H_{38}O_2$), 1,5% de lecitina e fase aquosa composta por uma solução de Tween[®] 80 a 1,5 %, foi submetida a diluição na proporção de 1:5 com água a 7°C. As nanopartículas lipídicas obtidas apresentaram tamanho médio de 49 nm.

Os lipídios mais adequados para utilização nesta técnica são os que possuem ponto de fusão entre 50-70°C, pois altas temperaturas promovem a rápida evaporação do solvente hidrofílico. Além dessa desvantagem de limitação dos lipídios apropriados, ha também o excesso de água obtido após a diluição da microemulsão e o excesso de tensoativos e co-tensoativos utilizados para obtenção da microemulsão (UNER, 2006).

Existem variações do método original proposto por Gasco (1993) como, por exemplo, a preparação de nanopartículas lipídicas pelo método de microemulsão sem a necessidade de diluir com água gelada a microemulsão recém preparada.

Khurana, Jain e Bedi (2013) prepararam nanopartículas lipídicas apenas submetendo a microemulsão quente a resfriamento em temperatura ambiente.

Também como exemplo de variações do método proposto inicialmente, Lin et al. (2007) prepararam NLS e CLN utilizando o método de microemulsão sem utilizar solvente orgânico hidrofílico e obtaram nanopartículas lipídicas com tamanho variando entre 25-120 nm e índice de polidispersão em torno de 0,2.

Outros autores também relatam a preparação de nanopartículas lipídicas, utilizando a metodologia de microemulsão, sem a utilização de solvente orgânico hidrofílico (DOKTOROVÁ et al., 2010; SOUZA et al., 2011; JAIN et al., 2008; JOSHI; PATRAVALE, 2008).

2.1.3.5 Fluido super crítico

Esta técnica de fluido super crítico (FSC) é mais recente, se comparada com as demais formas de preparo de nanopartículas lipídicas, e também traz algumas vantagens sobre as demais, por exemplo: possibilidade de esterilização do material obtido, produção de partículas em forma de pó e fácil implementação de produção em larga escala (*scale-up*). Geralmente as moléculas de escolha são proteínas, fármacos termolábeis e hidrofílicos (PATIDAR et al., 2010).

Técnicas baseadas em FSC estão em constante desenvolvimento e o uso de CO_2 está despertando interesse crescente. As vantagens do uso de CO_2 são: baixa toxicidade, baixa temperatura e moderada pressão para se alcançar o ponto crítico, e principalmente, preço acessível. Estas vantagens tornam esta técnica atrativa também para preparação de nanopartículas lipídicas sem a presença de solventes (*solvent-free*) (CAMPARDELLI et al., 2013).

Em comparação a outras técnicas de secagem, por exemplo, *spray drying* e HAP a quente, a técnica de FSC apresenta menor possibilidade de contaminação da amostra

porque o processo é realizado em um sistema fechado e inerte devido a presença de CO_2 (SALMASO et al., 2009). Existem diversas técnicas baseadas em SFC, entre elas, RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*), PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions*), GAS/SAS (*Gas/Supercritical Antisolvent*), ASES (*Aerosol Solvent Extraction System*), SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids*), que são selecionadas de acordo com a solubilidade dos constituintes no fluido supercrítico (PATIDAR et al., 2010).

Dentre as técnicas baseadas em SFC apresentadas anteriormente, a PGSS consiste na dissolução dos componentes da formulação de nanopartículas lipídicas em CO_2 no ponto crítico e a posterior expansão da solução obtida através de um aspersor, provocando a atomização da solução, evaporação do gás e, conseqüentemente, a precipitação dos lipídios. Esta técnica não requer o uso de solvente orgânicos e pode ser aplicada em materiais com baixo ponto de fusão, proporcionando condições ideais para incorporar moléculas termolábeis em lipídios com baixo ponto de fusão (MARTÍN et al., 2010; SALMASO et al., 2009).

García-González et al. (2010), utilizaram a técnica PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions*) para incorporar moléculas de diferentes polaridades (caféina, glutatona e cetoprofeno) em partículas lipídicas híbridas constituídas dos lipídios Lumulse[®] GMS-K e Cutina[®] HR, em conjunto com o mineral dióxido de titânio (TiO_2). O gás utilizado foi o CO_2 e a eficiência de incorporação das nanopartículas variou de acordo com a lipossolubilidade do fármaco utilizado.

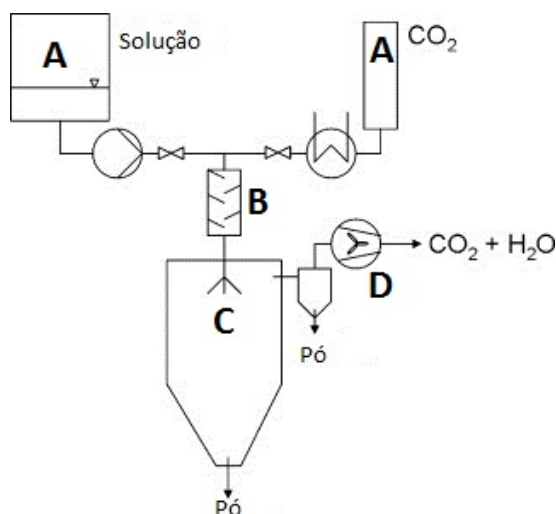
Nanopartículas lipídicas como carreador de insulina preparadas através de uma adaptação da técnica PGSS com tamanho entre 80–120 nm e 200–400 nm foram obtidas por Salmaso et al. (2009). Os autores aperfeiçoaram a etapa de atomização da amostra para aumentar a eficiência de incorporação da proteína. Mesmo utilizando DMSO na composição, a formulação obtida foi considerada *solvent-free*, pois a quantificação de DMSO após a secagem foi menor que o limite imposto pela FDA (*Food and Drug Administration*).

A Figura 6 apresenta um esquema do processo PGSS dividindo as etapas pelas letras A, B, C e D. Onde, em A ocorre o aquecimento e pressurização da formulação e do CO_2 para atingir as condições de pré-expansão; em B os constituintes da etapa A são misturados em um *mixer*; em C a mistura é expandida através da atomização em um ambiente de pressão atmosférica, onde as partículas são secas e coletadas no fundo do recipiente. Por último, em D ocorre a expulsão, na parte superior do recipiente, do CO_2 e dos constituintes da formulação evaporados. Neste local há um separador para coletar pó residual que foi arrastado juntamente com o gás (MARTÍN et al., 2010).

2.1.3.6 Emulsão dupla ou múltipla

A técnica de emulsão dupla ou múltipla é utilizada, na maioria dos casos, quando se empregam fármacos hidrofílicos, macromoléculas como a insulina e peptídeos (SARMENTO

Figura 6 – Descrição esquemática do método de fluido supercrítico (PGSS).



Fonte: adaptado de (MARTÍN et al., 2010).

et al., 2007; YANG et al., 2011; GALLARATE et al., 2009; GARCIA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2003). A emulsão dupla ou múltipla é um sistema disperso composto por três fases. Trata-se de um sistema onde há simultaneamente uma emulsão do tipo A/O e O/A, formando uma emulsão do tipo A/O/A. O ativo encontra-se na fase interna da emulsão do tipo A/O/A (SANTOS, 2011).

A relativa estabilização deste sistema é promovida por dois tipos de tensoativos, um lipofílico de EHL baixo para a primeira emulsão do tipo A/O e um hidrofílico de EHL alto para a segunda emulsão do tipo O/A (FANGUEIRO et al., 2012). Além de estabilizar o sistema disperso, o tensoativo tem a função de evitar a saída do fármaco para a fase externa durante a evaporação do solvente presente na emulsão (UNER, 2006).

A emulsão múltipla é uma etapa prévia na preparação de nanopartículas lipídicas. A obtenção das nanopartículas ocorre após a solidificação da fase lipídica da emulsão. Este fenômeno se dá, geralmente, através da diluição da emulsão A/O/A ainda quente em água fria (2-3°C) (LI et al., 2010; FANGUEIRO et al., 2012).

Pode-se também obter as nanopartículas lipídicas a partir da evaporação do solvente utilizado na fase oleosa da emulsão múltipla. Neste caso, a evaporação é realizada em temperatura ambiente sob agitação constante ou através de rota-evaporador sob pressão reduzida (GARCIA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2003; GARCIA-FUENTES et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

Uma desvantagem desta técnica é a pequena concentração de lipídio que pode ser utilizada. Enquanto em outras técnicas utilizam-se até 30% de lipídios na formulação, a técnica de emulsão múltipla dificilmente alcançará tais concentrações pois corre o risco de desestabilização do sistema do tipo A/O/A, inviabilizando a obtenção de nanopartículas lipídicas (FANGUEIRO et al., 2012).

A utilização da técnica de emulsão múltipla para preparação de NLS contendo o fármaco puerarin apresentou em análises de DSC maior desorganização das cadeias lipídicas quando comparada com NLS obtidas pelo método de microemulsão, sugerindo que a técnica de emulsão dupla ou múltipla proporciona maior capacidade de incorporação de fármaco pela matriz lipídica da NLS (LI et al., 2009).

Fangueiro et al. (2012) promoveram o recobrimento de nanopartículas lipídicas obtidas pelo método de emulsão dupla com alginato de sódio, com o objetivo de promover a adesão das nanopartículas em mucosas. O potencial zeta das nanopartículas passou de -0,60 mV para -7 mV, indicando o sucesso no recobrimento das mesmas com alginato.

2.1.3.7 Emulsificação-ultrassom

Esta metodologia segue o mesmo princípio da HAP à quente, no entanto, sem a utilização de homogeneizador a alta pressão. Todo o processo é realizado em temperatura acima da fusão dos lipídios e inicia-se com a preparação de uma pré-emulsão, que em seguida sofre dispersão por meio de uma sonda de ultrassom e posterior resfriamento para precipitação dos lipídios e formação da dispersão de nanopartículas (DAS; CHAUDHURY, 2011).

A metodologia de emulsificação-ultrassom apresenta a vantagem de ser mais econômica quando comparada com a HAP, pois utiliza equipamentos de menor custo e tem maior facilidade de execução. As desvantagens de utilizar a emulsificação-ultrassom são a possibilidade de contaminação da formulação com metais oriundos da sonda e também de ocorrência de polidispersão em algumas formulações. Estas desvantagens, no entanto, não impedem a utilização desta metodologia em escala experimental. Diversos autores relatam a utilização desta metodologia e a obtenção de nanopartículas com características de distribuição de tamanho, PDI e potencial zeta preditivas de estabilidade prolongada e distribuição de tamanho uniforme, como também eficiência de incorporação satisfatória (SCHWARZ et al., 2012).

Devido a semelhança entre as etapas das metodologias de HAP e emulsificação-ultrassom, Silva et al. (2011) compararam HAP e emulsificação-ultrassom na preparação de NLS. Partículas de tamanho nanométrico e com potencial zeta distantes de 0, em valores absolutos, foram obtidas em ambas metodologias, demonstrando assim, condições para estabilidade prolongada. As nanopartículas apresentaram também viabilidade celular acima de 90%, sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre as distintas metodologias.

Das et al. (2011) prepararam NLS contendo tretinoína pelo método de emulsificação-ultrassom. As nanopartículas lipídicas obtidas apresentaram tamanho menor que 120 nm, PDI menor que 0,2, potencial zeta de $|30|$ mV e eficiência de incorporação maior que 75%. A estabilidade das nanopartículas obtidas foi de 3 meses, armazenadas a 4 °C. Segundo o autor, o tempo de ultrassom empregado na pré-emulsão é inversamente proporcional ao tamanho e PDI das nanopartículas obtidas.

2.1.4 Utilização para uso tópico

Os CLN podem ser dispersos em veículos como emulsões, hidrogéis ou até mesmo ser utilizado na forma de dispersão e administrado por via tópica, pois apresenta reduzida possibilidade de provocar efeitos indesejados na pele. A composição lipídica do CLN é bem tolerada pelo tecido cutâneo, uma vez que os lipídios que fazem parte da sua composição apresentam baixa toxicidade e irritabilidade. Isto permite a utilização com segurança em pele com presença de lesões como também em tecido inflamado (BHASKAR et al., 2009).

A utilização de CLN para uso tópico é requerida quando se necessita proteger o fármaco incorporado contra degradação (fotodegradação, oxidação, hidrólise) e, com isso, aumentar a estabilidade da formulação. Utiliza-se também para promover liberação controlada de fármacos e quando se deseja penetração em camadas específicas do tecido cutâneo. Todas essas características proporcionadas pelo uso de CLN irão melhorar a eficiência do fármaco incorporado (NGUYEN et al., 2012).

Baroli (2010) realizou um levantamento bibliográfico com o objetivo de elucidar se nanopartículas (lipossomas, nanocápsulas, NLS, CLN), aplicadas por via tópica, seriam capazes de atravessar as camadas da pele e alcançar a circulação sistêmica. Quanto a NLS e CLN, Baroli (2010) afirma que nanopartículas com tamanho superior a 100 nm não são capazes de penetrar profundamente no estrato córneo (EC), através da rota transepidermal, por causa de suas dimensões e rigidez. Ainda segundo o autor, o aumento da permeação de fármaco provocada pelo uso de NLS e/ou CLN ocorre por causa do efeito oclusivo proporcionado pelas nanopartículas lipídicas e não pela penetração das mesmas na pele.

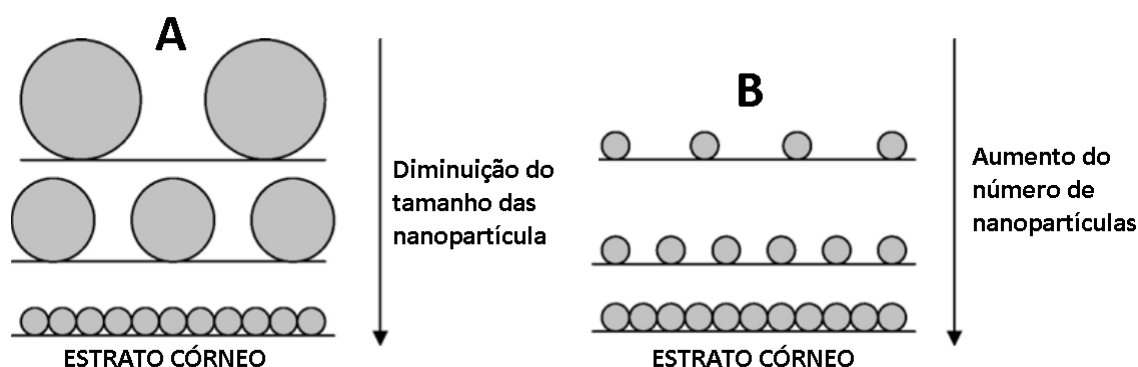
O tamanho reduzido do CLN e sua composição lipídica com afinidade pelo tecido cutâneo são responsáveis pela formação de uma espécie de filme sobre a pele, que reduz a perda de água transepidermica e promove a hidratação. Segundo Müller et al. (2007), o efeito oclusivo promovido por CLN pode ser modificado de duas formas: diminuindo o tamanho das nanopartículas (mantendo-se a concentração lipídica) ou aumentando o número de nanopartículas através do aumento da concentração lipídica (mantendo-se o tamanho das nanopartículas).

A Figura 7 exibe uma representação gráfica da relação entre o tamanho e o número de nanopartículas e a ocorrência de efeito oclusivo. Em (A) a concentração lipídica foi mantida, no entanto, o tamanho da nanopartícula foi reduzido e em (B) as nanopartículas mantiveram o seu tamanho inalterado, porém, houve incremento na concentração lipídica e, conseqüentemente, maior quantidade de nanopartículas.

A Figura 8 exibe uma imagem microscópica da pele de porco tratada com uma emulsão contendo nanopartículas lipídicas, destacando com a seta o filme formado sobre a pele e o intumescimento e aumento do volume do estrato córneo.

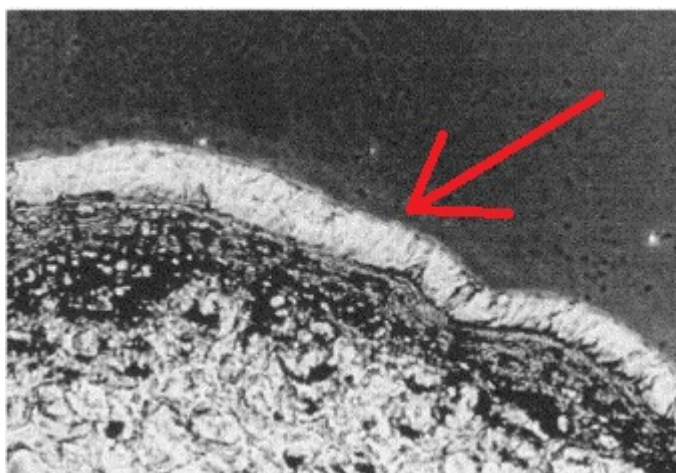
Como consequência da maior hidratação promovida pelo efeito oclusivo causado pelo CLN, a penetração de fármacos através do estrato córneo é facilitada. O tamanho na escala nanométrica resulta em aumento da superfície de contato dos CLNs, que possibilita

Figura 7 – Representação gráfica da relação tamanho e número de nanopartículas no efeito oclusivo causado por CLN.



Fonte: adaptado de (MÜLLER et al., 2007).

Figura 8 – Imagem do intumescimento e aumento do volume do estrato córneo promovido pelo efeito oclusivo causado por CLN.



Fonte: adaptado de (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

também o maior contato do fármaco com o estrato córneo, favorecendo a penetração (BHASKAR et al., 2009; RICCI et al., 2005; JENNING; SCHÄFER-KORTING; GOHLA, 2000).

Testes *in vitro* podem demonstrar o efeito oclusivo das nanopartículas lipídicas quando são usadas por via tópica. A aplicação de uma emulsão contendo nanopartículas lipídicas provoca o intumescimento e aumento do volume do estrato córneo, por influência do efeito oclusivo (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; POPLE; SINGH, 2006; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008).

Embora se tenham resultados positivos de efeito oclusivo em testes *in vitro*, os resultados *in vivo* mostram que CLN incorporados em excipientes que possuem efeito oclusivo ou em formas farmacêuticas como emulsões O/A oclusivas não aumentam a

oclusividade da formulação. No entanto, em formas farmacêuticas de uso tópico que não possuam efeito oclusivo, a adição de nanopartículas lipídicas pode promover efeito oclusivo sem o inconveniente aumento de brilho provocado por excipientes oclusivos (petrolato, vaselina sólida/liquida) (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; LOO; BASRI; ISMAIL, 2013).

Existe grande interesse por parte das indústrias farmacêutica e cosmética no desenvolvimento de formulações para via tópica devido as características desta via de administração em relação às demais vias e também por causa da maior facilidade de transposição das fases laboratorial e experimental para o mercado consumidor em virtude da maior facilidade de aprovação de registro de produtos para via tópica em comparação com produtos destinados às demais vias de administração (SANTOS MAIA et al., 2002; MÜLLER et al., 2007).

Ricci et al. (2005) desenvolveram CLN contendo o fármaco indometacina com o objetivo de aumentar a concentração do fármaco na pele, principalmente no estrato córneo. As nanopartículas foram dispersas em hidrogel e avaliadas em ensaios *in vitro* com pele humana e *in vivo*.

Os estudos *in vitro* mostraram que a quantidade de fármaco permeado foi menor no grupo contendo CLN do que nos grupos sem CLN e os testes *in vivo* demonstraram que o grupo submetido ao tratamento com CLN em hidrogel apresentou efeito anti-inflamatório por mais tempo que os demais, indicando que o fármaco incorporado em CLN apresentou maior penetração nas camadas da pele.

Bhaskar et al. (2009) desenvolveram NLS e CLN, com diâmetro médio de 250 a 350 nm e potencial zeta negativo, contendo o anti-inflamatório não esteroide flurbiprofeno e incorporaram em hidrogel para avaliar a liberação transdérmica em ensaios *in vitro* e a comparação da biodisponibilidade do fármaco administrado por via transdérmica e por via oral em ensaios *in vivo*. No ensaio *in vitro* foi utilizada pele da região abdominal de ratos da linhagem Wistar com os pelos removidos com uso de lâmina de barbear e no ensaio *in vivo* ratos machos e adultos da mesma linhagem do ensaio *in vitro*, no qual o grupo tratado pela via transdérmica, teve uma área de 9 cm² da pele da região dorsal depilada. Os resultados obtidos mostraram que os hidrogéis contendo NLS e CLN apresentaram liberação controlada por um período de 24 horas e promoveram aumento de 4,4 vezes na biodisponibilidade do flurbiprofeno quando comparado com a administração oral.

Há melhoria considerável no perfil de permeação de fármacos incorporados em CLN administrados por via tópica quando comparados com fármacos incorporados em formas farmacêuticas convencionais aplicados pela mesma via.

Diferentemente do apresentado nos estudos de Bhaskar et al. (2009), que compararam a utilização de CLN por via tópica com a via oral, Pathak e Nagarsenker (2009) realizaram um estudo onde NLS e CLN, com tamanho médio de partícula entre 72 e 76 nm, índice de polidispersão entre 0,4 e 0,5 e contendo o fármaco lidocaína, foram incorpora-

dos em géis constituídos de Noveon A11[®], glicerina e benzoato de sódio para efetuar a comparação com a formulação convencional de lidocaína dispersa em gel Xylocaina[®], ambas administradas por via tópica, através de ensaios *in vitro* em pele sem pelos da região abdominal de porquinho-da-índia (*guinea pig*) e *in vivo* por meio de avaliação da sensibilidade, em uma área depilada de 6,25 cm² das costas de porquinhos-da-índia (*guinea pig*) machos, através do teste de sensibilidade *pin-prick*.

Os resultados de permeação obtidos nos ensaios *in vitro* mostraram que as formulações contendo CLN promoveram a permeação de aproximadamente 50% do fármaco em um tempo de aproximadamente 24 horas e a formulação comercial Xylocaina[®] apresentou permeação completa em um intervalo de 6 a 8 horas. Nos ensaios *in vivo* os géis contendo NLS e CLN obtiveram eficácia superior, aumentando cinco e seis vezes a duração da analgesia, respectivamente, quando comparadas com a formulação comercial Xylocaina[®], que apresentou analgesia durante 1 hora.

Outro exemplo que demonstra o aumento da permeação de fármacos incorporados em CLN em comparação a formulações convencionais, ambos por via tópica, foi relatado por Nam, Ji e Park (2011), que utilizaram CLN contendo o fármaco tacrolimus, com tamanho médio de partícula entre 123–125 nm e potencial zeta entre -24 e -27 mV, incorporados em emulsões de ácido oleico para avaliar a permeação do fármaco *in vitro* através da pele de ratos sem pelo em células de difusão de Franz. A formulação contendo CLN apresentou permeação do fármaco na pele 1,64 vezes maior que a formulação comercial Protopic[®]. Os autores atribuíram a maior permeação do tacrolimus, obtida pela formulação contendo CLN, ao aumento da superfície de contato entre o fármaco e os corneócitos presentes no estrato córneo e ao perfil de liberação da formulação.

O desenvolvimento de formulações com finalidade de proteção solar contendo CLN apresentaram resultados promissores também. Sanad et al. (2010) incorporaram o filtro solar orgânico oxibenzona em CLN, com tamanho médio de 366 nm, índice de polidispersão 0,558 e potencial zeta -19,30 mV, e adicionaram em gel de Carbopol[®] 934 com o objetivo de avaliar *in vitro* o fator de proteção solar (FPS) e o fator de proteção contra eritema por radiação UVA. Foi observado após a avaliação, que o gel contendo CLN aumentou o FPS em mais de seis vezes e a proteção contra eritema por radiação UVA em mais de oito vezes em comparação com a oxibenzona em suspensão na mesma concentração da formulação contendo CLN.

A característica apresentada por CLN de proteção do fármaco incorporado contra degradação e a penetração nas camadas da pele foi avaliada por Gokce et al. (2012). Os autores desenvolveram NLS e CLN contendo resveratrol, que apresenta atividade anti-oxidante e é facilmente degradado em condições normais. Além de obter proteção do fármaco incorporado em ambos, Gokce et al. (2012) observaram também a penetração do fármaco na pele da região abdominal de ratos em ensaios *in vitro* com células de difusão de Franz, durante o período de 24 horas, sem sinais de permeação através da pele.

Segundo Gokce et al. (2012), a não ocorrência de permeação foi atribuída ao coeficiente de partição lipídio-água do resveratrol ($\log P$ em torno de 3), que mantém o fármaco na matriz lipídica das nanopartículas. Segundo os autores, fármacos com elevado valor de $\log P$ incorporados em nanopartículas lipídicas são liberados nas camadas externas da pele devido a ação de lipases, que degradam a matriz lipídica da NLS ou CLN.

Na área cosmética, há a possibilidade de proporcionar liberação controlada de perfumes a partir de nanopartículas lipídicas com o objetivo de prolongar a ação da essência por várias horas com uma única aplicação. A liberação do perfume, a partir de nanopartículas lipídicas, se mostrou mais prolongada que em emulsões convencionais (WISSING; MÄDER; MÜLLER, 2000b). Esta mesma utilidade se estende também à liberação de repelentes para insetos (WISSING; MÄDER; MÜLLER, 2000a; YAZIKSIZ-ISCAN et al., 2002).

2.1.5 Produtos disponíveis no mercado farmacêutico

A relativa facilidade de lançamento de produtos cosméticos, devido menores exigências de órgãos reguladores, é um dos motivos para que os produtos para uso tópico, que utilizam nanopartículas lipídicas, sejam disponibilizados no mercado primeiramente que os destinados a outras vias de administração e/ou aplicações.

Existem nanopartículas lipídicas sólidas, sem fármaco, disponíveis no mercado com o nome comercial Nanobase[®]. A sugestão de uso, proposta pelo fabricante, é de adição das nanopartículas em emulsões com ativos incorporados com a finalidade de promover maior efeito oclusivo. Esta forma de utilização facilitou a introdução desta tecnologia no mercado, pois ampliou as possibilidades de utilização.

Outro exemplo é a Nanopearls[®], desenvolvida pela empresa PharmaSol[®] GmbH, que também é utilizada como insumo farmacêutico para ser incorporada em cremes, loções, géis, batons. A finalidade da Nanopearls[®], segundo o fabricante, é de promover adesão à pele, efeito oclusivo, aumentar a hidratação, liberação controlada de fármacos, promover penetração na pele e proteção de fármacos sensíveis a fatores externos.

Empregando a propriedade conferida aos CLN de proteção de fármacos suscetíveis a degradação, a empresa Dr. Rimpler GmbH, com sede na Alemanha, desenvolveu um produto cosmético chamado Serum Nanorepair Q10, que utiliza as Nanopearls[®] com a coenzima Q10 incorporada. As ações cosméticas do produto são: promover efeito anti-oxidante e redução de rugas finas.

Posteriormente, a mesma empresa, lançou uma linha cosmética com nome comercial CUTANOVA[®]. Os produtos, que também possuem CLN na composição, apresentam propriedades como: hidratação, efeito anti-oxidante, anti-microbiana e anti-inflamatória.

Isabelle Lancray, uma empresa de origem francesa e pertencente ao grupo Dr. Rimpler GmbH, possui uma linha de produtos cosméticos chamada Surmer. Toda linha é baseada em Nanopearls[®].

Um creme, específico para o cuidados dos pés, foi lançado pela empresa Scholl com o nome Regenerationscreme Intensiv. O produto, contendo ureia como ativo, tem função de promover hidratação e possui tecnologia baseada em CLN, licenciada pela empresa alemã PharmaSol GmbH.

A empresa Amore Pacific, com sede na Coreia do Sul, lançou no mercado, em 2006, a linha de produtos cosméticos IOPE. Todos os produtos são baseados em CLN e estão disponíveis apenas para alguns países asiáticos. Um exemplo é o IOPE Super Vital, que contém extratos vegetais incorporados em CLN e apresenta atividade hidratante e anti-oxidante.

Alguns dos produtos disponíveis no mercado, e que foram citados no texto, podem ser visualizados na Figura 9.

Figura 9 – Fotografia de produtos disponíveis no mercado contendo nanopartículas lipídicas (NLS e CLN).



Fonte: <http://www.nanoparticles.org/pdf/P2009-Keck.pdf>

2.2 Óleo de pracaxi

Os óleos vegetais de origem amazônica têm sido bastante utilizados em diversos setores econômicos, principalmente no farmacêutico e cosmético, pois além de proporcionarem um excelente apelo de *marketing*, por serem oriundos da rica e ainda pouco explorada biodiversidade da Amazônia, podem conferir propriedades únicas (BARATA, 2012; BARATA, 2005).

O Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) pertence ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Mimosaceae, gênero *Pentaclethra* e espécie *P. macroloba*. Ocorre naturalmente da Nicarágua até a Amazônia, incluindo as Guianas. No Brasil ocorre, especificamente, nos estados do Amapá, Pará e Amazonas. É encontrado em áreas de igapó (floresta alagada) como também em terra firme.

As sementes são dispersas na floresta por meio da água em regiões de igapó como também por animais em regiões de terra firme. A árvore exibe tamanho médio (8 m a 14 m), possui um fruto em forma de vagem com 20 cm a 25 cm de comprimento, encurvado e contém de 4 a 8 sementes.

Um quilo de sementes é composto por aproximadamente 35 vagens, as quais contêm de 30 % a 45 % de óleo. No cultivo da planta, a emergência ocorre entre 30 a 40 dias e apresenta taxa de germinação das sementes relativamente alta. O seu desenvolvimento na várzea é rápido e em terra firme o pracaxi tolera bem a poda seletiva (MEYER, 1993; JOKER, DORTHE; SALAZAR, 2000).

É comum encontrar o Pracaxi na mesma área onde encontram-se outras espécies como *Carapa guianensis*, *Pterocarpus officinalis* Jacq, *Stryphnodendron microstachyum* Poepp, entre outras (WILLIAMSON; COSTA, 2000; JOKER, DORTHE; SALAZAR, 2000). A Figura 10 apresenta uma imagem do Pracaxi, do fruto em forma de vagem e das sementes.

Do ponto de vista ecológico, a espécie *Pentaclethra macroloba* é uma das alternativas utilizadas em regiões de reflorestamento e em áreas de floresta em regeneração, pois apresenta papel relevante na recuperação da fertilidade do solo em áreas desmatadas. Por tratar-se de uma leguminosa, é um bom fixador de N₂ e, conseqüentemente, apresenta grande potencial de restauração de C, N e F no ecossistema (SHEBITZ; EATON, 2013; EATON; ANDERSON; SAUNDERS, 2012).

O gênero *Pentaclethra* é representado por apenas 3 espécies, entre elas, o *Pentaclethra macroloba* (Pracaxi). O óleo é extraído das sementes através de processo de extração à frio sob pressão e sem utilização de solventes orgânicos. A época de coleta das sementes compreende os meses de janeiro à maio, porém, a alta estação é de fevereiro à março (SANTOS COSTA et al., 2013).

O óleo de pracaxi é utilizado, no setor cosmético, em produtos voltados, principalmente, para o uso capilar. A Beraca, empresa brasileira fornecedora de matéria-prima para indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, desenvolveu um insumo para ser adicionado em produtos de tratamento corporal e capilar obtido a partir do óleo de pracaxi. Este insumo foi lançado no mercado com a sigla BBA (*BioBehenic Active System*) e é exportado para diversos países, entre eles, Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra.

Um dos destinos é a empresa francesa L'Oréal, que lançou uma linha de produtos cosméticos capilares com o nome Kérastase[®] contendo o BBA na formulação.

No setor cosmético de produtos para uso na pele, há a possibilidade de utilização

Figura 10 – Imagens da *Pentaclethra macroloba* (Pracaxi) - árvore, fruto e sementes.

Fonte: <http://www.amazonoil.com.br/en/products/oils/pracachy.htm>

do óleo de pracaxi, incorporado em cremes ou géis, como agente de despigmentação (tratamento de melasmas), pois o óleo de pracaxi apresentou ação inibitória *in vitro* sobre a enzima tirosinase de cogumelo e, conseqüentemente, diminuição da biossíntese de melanina, responsável pela cor da pele (TEIXEIRA et al., 2012).

O óleo de pracaxi pode ser encontrado em patentes de produtos para uso transdérmico. A utilização do óleo, como um dos componentes destas formulações, está associada a alta concentração de ácidos oleico e behênico na constituição de ácidos graxos do óleo, que proporcionam ação emoliente e hidratante e, por isso, devolvem a hidratação e permeabilidade da pele. Estes ácidos graxos, presentes no óleo, quando utilizados de forma isolada podem causar irritação à pele, no entanto, esta ação irritante é minimizada quando estão associados na forma de triglicerídeos presentes no óleo, tornando possível a utilização (BASSANI; BANOVA, 2012; RAY II, 2015; CATHERINE; VINCENT, 2015a; CATHERINE; VINCENT, 2015b).

Um excipiente de uso tópico denominado PracaSil™ Plus, desenvolvido pela PCCA®

e constituído de silicone anidro contendo óleo de pracaxi, foi lançado no mercado norte americano com a indicação de uso para o tratamento de cicatrizes. Segundo o fabricante, o PracaSil[®] Plus apresentou resultados promissores na cicatrização de feridas cutâneas, diminuição de cicatrizes e marcas deixadas por queimaduras. A atividade cicatrizante do PracaSil[®] Plus pode ser atribuída à composição de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de pracaxi, principalmente, os ácidos linolênico, linoleico e oleico (BANOV; BANOV; BASSANI, 2014).

Os ácidos graxos insaturados são amplamente utilizados em formulações tópicas para tratamento de feridas cutâneas e úlceras de decúbito, pois podem atingir as camadas mais profundas da epiderme e, com isso, ser incorporados aos fosfolípidos das membranas celulares e às acilglucosilceramidas. Então, as acilglucosilceramidas sofrem uma reação de lipo-oxigenação enzimática, levando à formação de peróxidos que influenciam o equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação celular da epiderme (CAVAZANA et al., 2009).

Adicionalmente, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA - *Poly Insaturated Fatty Acid*) promovem inibição de produção de óxido nítrico no local da ferida, promovendo também atividade cicatrizante. Os ácidos linoleico, linolênico e oleico são importantes precursores do ácido araquidônico - responsável por modificar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a cicatrização (CARDOSO et al., 2004).

Por apresentar atividade cicatrizante e anti-inflamatória, o fabricante do PracaSil[®] Plus sugere a utilização do mesmo como excipiente de fármacos como: glicocorticóides, anestésicos, anti-oxidantes no tratamento de acne, queimaduras, assaduras, queloides, cicatrização de suturas realizadas em cirurgias, prevenção de cicatrizes e clareamento de pele (tratamento de melasma).

Além do óleo, outras partes do Pracaxi apresentam atividade biológica de interesse farmacêutico. O extrato etanólico das sementes contém saponinas que apresentam ação larvicida contra a espécie *Aedes aegypt* (SANTIAGO et al., 2005).

Em outro estudo, o extrato aquoso apresentou atividade larvicida contra a espécie *Helicoverpa zea* (Boddie) atribuída à inibição de proteases como tripsina e quimotripsina (CHUN et al., 1994).

Há também a utilização do macerado das cascas do Pracaxi, em forma de cataplasma, em picadas de cobras e escorpiões (SILVA et al., 2005).

Dois polipeptídeos foram isolados e identificados como os responsáveis por esse efeito inibidor de serino proteases - PmSTT e PmLTT . O uso de genes que expressam essas proteínas em vegetais geneticamente modificados podem impedir pragas agrícolas causadas por insetos e larvas sensíveis (CHEN, 1998; RATHBURN; CZAPLA; SCHUBERT, 1997; CHEN; SCHUBERT; CZAPLA, 1999).

Em uma investigação da ação citotóxica de extratos aquosos e orgânicos de 352 espécies vegetais da amazônia, na dose de 100 µg/mL, em linhagens de células PC-3 de câncer de próstata, foi observado ação inibitória ou letal contra as células PC-3 em apenas

17 extratos, entre os quais, o extrato orgânico (metanol:diclorometano 1:1) das cascas do caule do praxaxi que apresentou 22 % de inibição do crescimento celular (SUFFREDINI et al., 2006).

Silva et al. (2007) isolaram saponinas triterpênicas a partir do extrato aquoso de cascas do caule do praxaxi, que apresentaram atividade anti proteolítica e anti hemorrágica ao veneno de cobra, principalmente, no local da picada. O mecanismo de ação não foi esclarecido pelos autores. No entanto, a atividade proteolítica induzida por metaloproteases foi inibida entre 80 % e 90 % nos testes *in vitro* e a inibição da hemorragia foi dependente do momento da aplicação da injeção intradérmica em camundongos Swiss, pois ocorreu inibição em 55 % a 70 % quando aplicada juntamente com veneno e de 10 % a 15 % quando aplicada 5 minutos após a aplicação do veneno. A adição das saponinas triterpênicas, isoladas do extrato aquoso de cascas do caule do praxaxi, como complemento de soros antifídicos utilizados atualmente e também o uso das mesmas como modelos moleculares para obtenção de novas moléculas mais potentes e eficazes são perspectivas futuras de estudo (SILVA et al., 2005; VIANA et al., 2004; VIANA; BRAZ-FILHO, 2004).

Também foi atribuído ao extrato aquoso das folhas, cascas e frutos do praxaxi atividade bactericida contra *Klebsiella ozaenae* e *Acinetobacter baumannii*. O volume de 30 µL do extrato aquoso na concentração de 2,275 µg/µL foi comparado com 30 µL do controle positivo ciprofloxacino na concentração de 16,6 µg/mL em teste de inibição de crescimento bacteriano avaliado por meio de observação do halo de inibição formado em teste de difusão em agar. O extrato aquoso apresentou halo de inibição frente a *Klebsiella ozaenae* e *Acinetobacter baumannii* de 3,96 mm ± 0,15 e 5,76 mm ± 0,25, respectivamente, que correspondem a 49,5 % e 52,4 % do obtido pelo controle positivo ciprofloxacino (OLIVEIRA et al., 2013).

O extrato etanólico das cascas do praxaxi foi fracionado por LEAL et al. (2011) e a ação da fração acetato de etila apresentou atividade contra as bactérias gram-negativas multirresistentes *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp* e *Klebsiella pneumoniae* atribuída ao ácido elágico que, segundo os autores, foi possivelmente originado de taninos hidrolisáveis. Além disto, a concentração de 256 µg/mL da fração avaliada não apresentou citotoxicidade em células eucarióticas, sugerindo toxicidade seletiva da mesma.

O óleo de praxaxi também teve sua utilização estudada na avicultura, na forma de aditivo promotor de crescimento em dietas para frangos de corte, como possível substituto do antibiótico virginiamicina. Foi avaliada a viabilidade desta substituição e verificado que o uso do óleo não afetou o desempenho das aves quando comparado com o grupo submetido à dieta com virginiamicina (PEREIRA, 2012).

2.3 Cera de carnaúba

A cera de carnaúba é extraída a partir das folhas da palmeira brasileira da espécie *Copernicia prunifera*, que cresce principalmente na região nordeste. Prevalendo nos

estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, que correspondem a maior parte da produção nacional. Pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Arecales, família Areaceae, gênero *Copernicia* e espécie *C. prunifera*. O período de produção é de Julho à Dezembro. Existem outras espécies do gênero *Copernicia* como: *Copernicia tectorum* na Venezuela e *Copernicia alba* na Bolívia e Paraguai. No entanto, somente na espécie brasileira é possível extrair cera de suas folhas. Fato que torna o Brasil como único país do mundo que produz cera de carnaúba (CARVALHO, 2005).

A Figura 11 exibe a fotografia de uma carnaubeira, dando destaque para as folhas de onde se obtém a cera de carnaúba. A carnaubeira possui diversas utilidades na construção civil, artesanato e na indústria. Contudo, a cera é seu principal produto de interesse econômico. Ela é utilizada em diversas áreas, como: alimentícia, eletrônica, cosmética e farmacêutica.

Figura 11 – Fotografia da *Copernicia prunifera* (Carnaubeira).



Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Carnauba.jpg>

A cera é obtida a partir do pó extraído das folhas da carnaubeira (pó cerífero), que em seguida é submetido a aquecimento em um processo industrial de produção da cera. Este processo se dá por várias etapas, onde o produto final resulta em quatro tipos de cera que variam da origem do pó cerífero e a utilização, ou não, do processo de clarificação da cera (CARVALHO; GOMES, 2008).

O pó cerífero é produzido pela planta como resposta ao longo período de estiagem

que o vegetal é submetido e tem como objetivo evitar a perda de água por evaporação e também proteção contra fungos. O pó se deposita em uma camada grossa sobre as folhas formando um filme impermeabilizante.

As características do pó cerífero, observadas na natureza, de proteger contra agentes externos e impedir a perda de água por evaporação estimulou o uso da cera de carnaúba na área alimentícia, com o objetivo de aumentar o tempo de armazenamento e conservação de frutos, evitando a deterioração e mantendo as condições de consumo e comercialização por mais tempo (FARIAS, 2008).

A cera consiste de uma mistura complexa de ésteres de alto peso molecular de ácidos e hidroxiácidos. Os principais componentes químicos da cera de carnaúba são ésteres alifáticos, álcoois livres, ésteres hidroxilados, diésteres alifáticos p-metoxicinâmicos e diésteres alifáticos p-hidroxicinâmicos, compostos de cadeias de diversos tamanhos, onde predominam ácidos com 26 carbonos e álcoois com 32 carbonos (VANDENBURG; WILDER, 1970).

Apresenta ponto de fusão entre 81 °C e 86 °C, e por isto, é a cera natural com maior dureza e ponto de fusão, no entanto, proporciona baixa viscosidade quando fundida. Possui EHL em torno de 12 e a classificação GRAS (*Generally Recognized As Safe*) certificada pelo FDA (*U.S Food and Drug Administration*), que assegura o seu uso em produtos alimentícios e cosméticos (TAMJIDI et al., 2013; MILANOVIC et al., 2010; VANDENBURG; WILDER, 1970).

Observando as características apresentadas pela cera de carnaúba, pesquisadores da área cosmética inferiram a possibilidade da sua utilização em formulações com função de proteção solar. Balogh, Velasco e Pedriali (2011), Lacatusu et al. (2014), González, Fernández-Lorente e Gilaberte-Calzada (2008) relataram o uso da cera de carnaúba em artigos de revisão sobre fotoproteção. Segundo os autores, a sua composição é rica em cinamatos, que em associação com protetores solares inorgânicos, como o dióxido de titânio (TiO_2), resulta em uma dispersão estável e de viscosidade adequada para preparação de filtros solares e, principalmente, com fator de proteção solar (FPS) e proteção contra raios do tipo UVA adequados.

A propriedade de proteção solar da cera de carnaúba em combinação com filtros solares inorgânicos como: sulfato de bário (BaSO_4), carbonato de estrôncio (SrCO_3) e dióxido de titânio (TiO_2) também foi relatada em outros trabalhos. Foi verificado que a incorporação dos filtros solares inorgânicos citados anteriormente em nanopartículas de cera de carnaúba e oleato de decila resultou em maior efeito de proteção solar na região UVA (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2007; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2005; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006b; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006a).

Há também relatos na literatura da utilização de cera de carnaúba como constituinte de CLN contendo filtros solares orgânicos. Niculae et al. (2014) desenvolveram CLN através

da metodologia de HAP, contendo cera de carnaúba na composição lipídica, com tamanho médio de 160 nm e com os filtros solares orgânicos avobenzona, bemotrizinol e octocrileno incorporados. A formulação avaliada apresentou eficiência de proteção solar duas vezes maior que a amostra de referência contendo os mesmos filtros solares orgânicos em emulsão.

O desenvolvimento de NLS e CLN com a cera de carnaúba como uma opção de constituinte lipídico foi investigado por MITREA, OTT e MEGHEA (2014), que verificaram a influência de vários lipídios sólidos no tamanho e estabilidade física de CLN preparados pelo método de HAP. Os autores relataram a obtenção de CLN a partir de diferentes misturas de cera de carnaúba e monoestearato de glicerila com três óleos de origem vegetal (óleo de framboesa, arroz e romã). Os CLN obtidos apresentaram tamanho médio em torno de 200 nm e potencial zeta entre -30,4 e -64 mV, que segundo os autores conferiu excelente estabilidade física e baixa probabilidade de agregação das nanopartículas.

Além de CLN, micropartículas de cera de carnaúba foram preparadas com o intuito de encapsular aromas artificiais para uso no setor alimentício (MILANOVIC et al., 2011).

Na área cosmética, a cera de carnaúba possui aplicação em produtos para tratamento capilar. Rossan (2011) desenvolveu micro e nanopartículas lipídicas sólidas através das metodologias de *spray cooling* e nano-emulsificação de baixa energia, a última, por meio do processo de inversão de temperatura de fases, com o objetivo de encapsular um ativo promotor de brilho capilar (*Activeshine Amazon*) para aplicação cosmética. O insumo cosmético *Activeshine Amazon* foi incorporado na matriz lipídica de micro e nanopartículas lipídicas sólidas e apresentou propriedades físico-químicas como diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta adequados para aplicação capilar. A formulação obtida apresentou potencial de obter maior eficácia em comparação às formulações que utilizam substâncias não encapsuladas.

A utilização da cera de carnaúba como constituinte de emulsões para obtenção de batons também foi relatada por Taylor (2011), que obteve um produto com propriedade doadora de brilho para os lábios, menor possibilidade de separação do óleo (óleo de rícino) da formulação e com capacidade de manter a estrutura do produto final consistente.

2.4 Dexametasona

A dexametasona (DXM) é um dos membros da classe dos fármacos corticosteróides, apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco e inodoro, possui código CAS (*Chemical Abstracts Service*) 50-02-2, peso molecular 392,46, ponto de fusão 262 °C, densidade 1,32 mg/cm³, fórmula molecular C₂₂H₂₉FO₅ e absorção máxima no espectro ultravioleta (UV) em 239 nm.

A solubilidade da DXM em água, obtida experimentalmente em temperatura de 25 °C e em modelos teóricos, encontra-se entre 0,1 mg/mL e 0,0505 mg/mL, respectivamente (O'NEIL, 2013; BECK et al., 2003; HUUSKONEN; SALO; TASKINEN, 1997; YALKOWSKY; DANNENFELSER, 1992; TETKO et al., 2005). Complementarmente,

Einmahl et al. (1999) determinaram experimentalmente a solubilidade da DXM a 37 °C e obtiveram dissolução de 1 mg/mL em água. Demonstrando assim, que o aumento de temperatura do meio de dissolução proporcionou incremento de dez vezes na solubilidade da DXM em água.

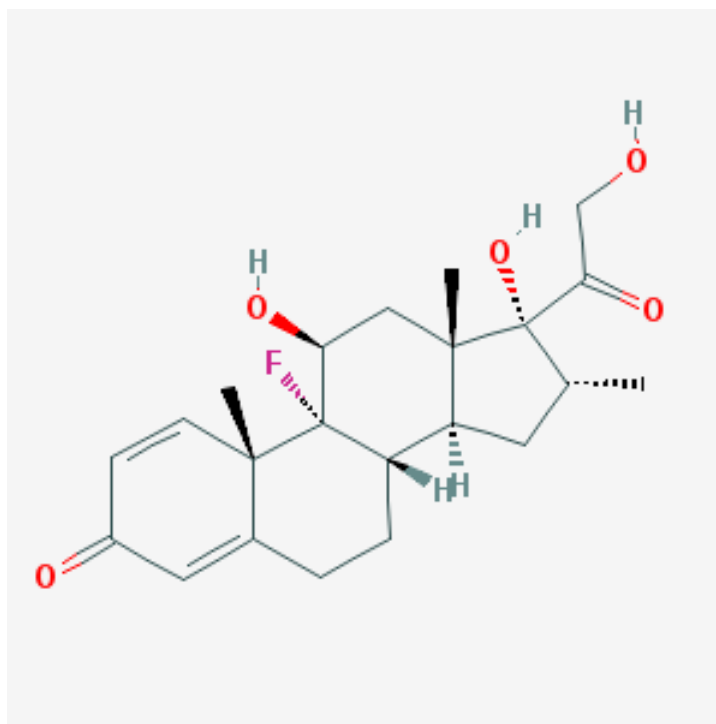
Adicionalmente, a DXM apresenta solubilidade em tampão HEPES de 0,074 mg/mL (GÓMEZ-GAETE et al., 2007), 0,079 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4 (MARCHIORI et al., 2010), 1 mg/mL em etanol e 30 mg/mL em DMSO (O'NEIL, 2013).

O coeficiente de partição $\log P$ octanol/água, obtido por diferentes métodos de determinação (experimentais e teóricos), encontra-se entre 1,68 e 1,93 (SHOSHTARI; WEN; ALANY, 2008; HANSCH; LEO, 1995; TETKO et al., 2005; MACHATHA; YALKOWSKY, 2005). Einmahl et al. (1999), determinaram experimentalmente o coeficiente de partição octanol/tampão fosfato pH 7,4 da DXM em temperatura de 37 °C e obtiveram o valor de $\log P$ 1,33.

O pK_a da molécula de DXM é 12,42 (WEBER, 2008) e, segundo critérios de classificação biofarmacêutica, pode ser classificada como fármaco pertencente às classes II (alta permeabilidade e baixa solubilidade) ou IV (baixa permeabilidade e baixa solubilidade) dependendo da dose utilizada (YU et al., 2002).

A estrutura química da molécula pode ser observada na Figura 12.

Figura 12 – Estrutura química da dexametasona.



Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743>

A DXM é utilizada, por via tópica, para o tratamento de processos inflamatórios

causados por psoríase e dermatite atópica, por exemplo. A sua classificação terapêutica está relacionada a efeitos vasoconstritor, anti-inflamatório, imunossupressor e anti-proliferativo. As células alvo para ação da DXM são os queratinócitos e fibroblastos localizados na epiderme viável e derme, respectivamente (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; BOS; SPULS, 2008).

Os medicamentos de uso tópico contendo fármacos glicocorticóides são classificados, segundo a *National Psoriasis Foundation*, de acordo com a potencia farmacológica e a habilidade de penetrar na pele e alcançar as camadas referentes à epiderme viável e derme. Segundo estes critérios, medicamentos contendo dexametasona pertencem à classe de menor potência farmacológica.

A *British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain* classificou medicamentos contendo DXM como de baixa potência também, no entanto, os critérios de avaliação não levaram em consideração a natureza do excipiente utilizado (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008).

Devido a classificação de baixa potência farmacológica, a DXM pode ser utilizada em regiões de pele sensível como, por exemplo, face e região axilar. Também apresenta maior segurança para utilização em crianças e idosos (HORN et al., 2010).

Os efeitos indesejáveis oriundos da administração tópica de glicocorticóides estão relacionados, principalmente, a ação anti-proliferativa exercida sobre os queratinócitos e fibroblastos, que causa atrofia e diminuição da espessura da pele. Além dos efeitos citados anteriormente, há a possibilidade do glicocorticóide tópico interferir na flora bacteriana da pele, aumentando assim, a possibilidade de ocorrência de infecções cutâneas oportunistas (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; KORTING; KERSCHER; SCHÄFER-KORTING, 1992; SUDHAPRIYADHARSHINI, 2014; KAO et al., 2003).

A atrofia da pele pode resultar na ocorrência de estrias em áreas suscetíveis e provoca uma modificação irreversível no local afetado. Outros efeitos indesejáveis relacionados ao uso de glicocorticóides são: acne, púrpura e telangiectasias (SWEETMAN, 2009; HENGGE et al., 2006).

A DXM é encontrada no mercado farmacêutico nacional, na forma acetato de dexametasona, em produtos de uso tópico na forma farmacêutica creme, com nome comercial Dexason[®] para o medicamento de referência. A posologia recomendada é de aplicação de uma pequena quantidade do creme no local afetado 2 ou 3 vezes por dia.

A dexametasona, nas formas base e acetato, foram incorporadas a sistemas nanoestruturados em diversos estudos e apresentaram eficácia terapêutica maior em comparação à DXM em formas farmacêuticas convencionais (CEVC; BLUME, 2004; BECK et al., 2003; SALIMI; NEZHAD; MOGHIMIPOUR, 2015; LI et al., 2014; TUNG; HUYEN; CHI, 2015). Além da DXM, outros fármacos glicocorticóides também foram incorporados em diversos sistemas nanoestruturados para uso tópico (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; DOKTOROVÁ et al., 2010; HU et al., 2002; HU et al., 2006; MAIA; MEHNERT;

SCHÄFER-KORTING, 2000; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2004).

2.5 Pele e permeabilidade cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano, compreende cerca de 10% da massa corpórea de um indivíduo e cobre a área de 2 m², aproximadamente. Apresenta origem ectodérmica (queratinócitos e melanócitos) e mesodérmica (fibroblastos, leucócitos e vasos) para a epiderme e derme, respectivamente. Serve como barreira de proteção contra a entrada de agentes externos (infecções, agentes mecânicos e raios ultravioleta) e também como proteção contra a perda excessiva de água e outros constituintes corporais para o meio externo. Mantém a homeostase endógena através da regulação do balanço hidro eletrolítico e da temperatura corporal. Além disto, tem papel importante no metabolismo através da síntese de vitamina D, manutenção da homeostase e no sistema sensorial por meio do tato e da percepção da temperatura do ambiente (SPELLBERG, 2000).

A pele permite a entrada de poucos agentes externos apresentando permeabilidade muito menor que a de outros tecidos, como por exemplo, o epitélio gastrointestinal e dos pulmões. O estrato córneo é responsável, em grande parte, pela função de barreira de proteção conferida à pele (FARTASCH, 1996).

A pele é dividida em:

- Estrato córneo: composto por corneócitos, apresenta espessura variada entre 10-20 µm quando seco e até 40 µm quando hidratado. Esta camada apresenta estrutura semelhante a de uma parede de tijolos descrita pelo modelo "*brick and mortar*", que compara os corneócitos a tijolos e a matriz lipídica em camadas lamelares, que circunda os corneócitos, ao cimento (TROMMER; NEUBERT, 2006; BOUWSTRA; PONEC, 2006). Esta conformação estrutural dificulta a entrada de fármacos aplicados por via tópica e se apresenta como um desafio tecnológico para o desenvolvimento de medicamentos de administração tópica com o objetivo de promover efeito local por meio do acúmulo do fármaco nas camadas superficiais da pele ou efeito sistêmico ao se alcançar as camadas mais profundas (derme), onde se localizam os capilares na pele (PRAUSNITZ et al., 2008).
- Epiderme: camada mais externa da pele e é composta por cinco camadas: córnea (exposta ao meio externo), lúcida, granulosa, espinhosa e basal (germinativo), sendo que as 4 últimas, juntas, formam a epiderme viável.
- Derme: está localizada abaixo da epiderme. Tem a espessura de 3-5 mm e compreende a região onde estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos, e terminações nervosas da pele. É constituída de tecido conectivo e nesta região que nutrientes e oxigênio são oferecidos à pele (El Maghraby; BARRY; WILLIAMS, 2008).

- Tecido subcutâneo (hipoderme): camada mais interna, que atua como isolante térmico. As glândulas sebáceas e sudoríparas se originam da hipoderme e atravessam as camadas superiores até atravessarem o estrato córneo.
- Apêndices cutâneos: folículos capilares, dutos sudoríparas, glândulas.

Os folículos capilares são distribuídos por toda a superfície corporal, com exceção da sola dos pés, palma das mãos e lábios. Cada folículo está associado a uma glândula sebácea de diâmetro entre 200 e 2000 μm que secreta um sebo composto por triglicerídeos, ácidos graxos e ceras que protegem, lubrificam e mantêm o pH da pele em torno de 5,5. As glândulas écrinas são estruturas epidérmicas que secretam uma solução de eletrólitos com pH em torno de 5 e que é responsável, principalmente, pela regulação da temperatura corpórea. A secreção desta glândula também está relacionado a fatores emocionais e de resposta ao *stress* por meio do sistema nervoso simpático.

As substâncias produzidas por tais glândulas, e que conferem proteção à pele, apresentam diminuição gradativa na sua produção conforme o avanço da idade, tornando a pele desprotegida contra agressões físicas e/ou químicas do ambiente. Esta condição é um fator de risco para o surgimento de doenças de pele. Um exemplo de fácil percepção é a diminuição da flexibilidade da pele e o aparecimento de rugas com o passar do tempo. Isto ocorre, entre outros fatores, devido a diminuição da secreção de sebo e, conseqüentemente, a propriedade oclusiva promovida pelo mesmo, tornando a pele desidratada e favorecendo o surgimento de ressecamento e perda de flexibilidade do tecido cutâneo (VERDIER-SÉVRAIN; BONTÉ, 2007).

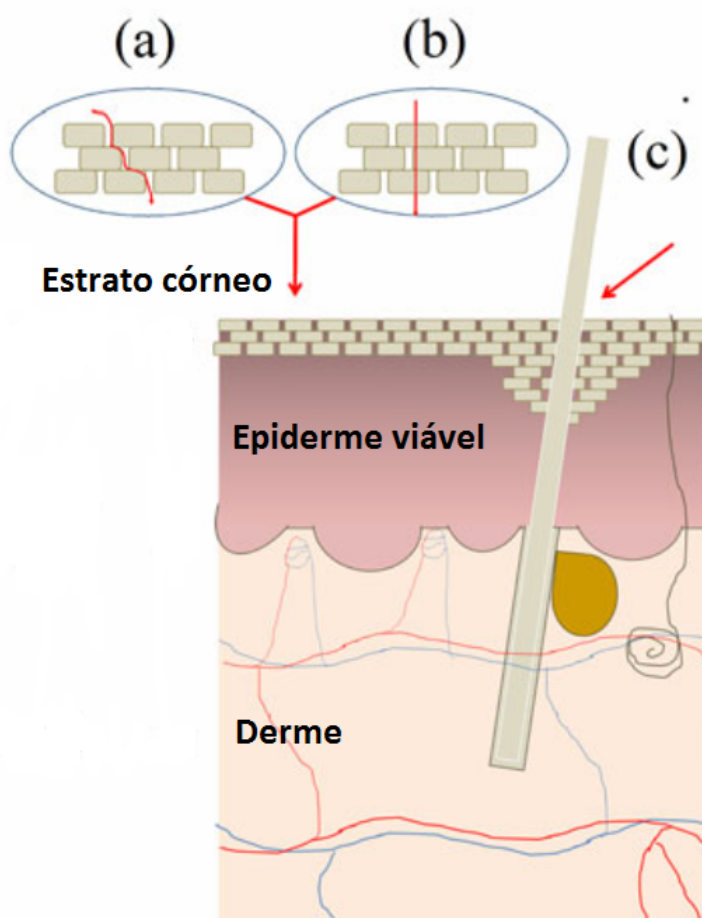
A pele é considerada com uma barreira de proteção do ponto de vista fisiológico, no entanto, do ponto de vista nanotecnológico de sistemas de liberação de fármacos é vista como uma porta de entrada de agentes terapêuticos (MÜLLER et al., 2007). Esta possibilidade incentiva o desenvolvimento de formulações capazes de transpor a barreira imposta pela pele e entregar fármacos em seu local de ação, sem causar dano à sua integridade e função fisiológica principal de proteção (ZHAI; ZHAI, 2014; RANCAN; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2014).

Conhecer os parâmetros que influenciam a permeabilidade da pele é importante para obter sucesso na terapia tópica. O uso de formas farmacêuticas de aplicação tópica têm como objetivo: efeito local com ação cosmética, transporte de fármaco através da pele buscando efeito sistêmico, ação superficial com ausência ou diminuição de efeito sistêmico, alcançar camadas profundas da pele e, por ultimo, não absorção em qualquer camada da pele. Para alcançar estes objetivos, que se mostram divergentes entre si, vários mecanismos conhecidos de penetração de substâncias através pele podem ser utilizados, exceto na situação em que não se deseja absorção em qualquer camada da pele. As rotas de penetração na pele são: difusão através da epiderme por meio das estruturas anexas da pele (folículo capilar e glândulas), intercelular (regiões interlamelar no estrato

córneo) e intracelular. Cada uma apresenta as características necessárias para o tipo de efeito desejado (ESCOBAR-CHÁVEZ; DÍAZ-TORRES, 2012; El Maghraby; BARRY; WILLIAMS, 2008; BOLZINGER et al., 2012).

A Figura 13 apresenta um desenho esquemático das camadas que constituem a pele (estrato córneo, epiderme viável e derme) e as rotas de permeação cutânea: (a) intercelular, (b) intracelular e (c) folicular e/ou glandular.

Figura 13 – Desenho esquemático da pele das camadas que constituem a pele e as rotas de permeação cutânea.



Fonte: adaptado de (POHLMANN, 2011).

A permeação de fármacos através das rotas disponíveis pode ser aumentada através de três mecanismos: aumento da difusão do fármaco através da pele, aumento da solubilidade do fármaco na pele e aumento do grau de saturação do fármaco na formulação. A permeação de fármacos através da pele é limitada pelo estrato córneo e, por isso, o fluxo de fármaco através do mesmo é descrito através da primeira lei de Fick, representada pela Equação 2.3. Onde J é o fluxo de fármaco através do estrato córneo, D_m é o coeficiente de difusão do fármaco, $c_{s,m}$ é a solubilidade do fármaco, L é a espessura da membrana (pele), c_v é a concentração de fármaco dissolvido no veículo e $c_{s,v}$ é a solubilidade do fármaco no

veículo (MOSER et al., 2001; SANTOS et al., 2011).

$$J = \frac{D_m c_{s,m}}{L} \times \frac{c_v}{c_{s,v}} \quad (2.3)$$

O aumento do coeficiente de difusão do fármaco através da pele pode ser obtido pela promoção da desorganização do lipídios que constituem o estrato córneo. Esta desorganização permite maior difusão através do estrato córneo. Ácidos graxos são frequentemente empregados com esta finalidade e o ácido oleico é um exemplo, pois induz a separação das fases lamelares dos lipídios do estrato córneo. Outras substâncias que apresentam o mesmo efeito sobre os lipídios do estrato córneo são: dimetilsulfóxido (DMSO), azona, etanol, tensoativos (MOSER et al., 2001; JANTHARAPRAPAP; STAGNI, 2007; CHI, 1995; ALBERTI et al., 2001; BHASKAR et al., 2009; HADGRAFT; LANE, 2005; WILLIAMS; BARRY, 2012).

O aumento da solubilidade do fármaco na pele é obtido com o uso de substâncias como propilenoglicol, etanol e tensoativos. Estas substâncias possuem afinidade pelo estrato córneo e o fármaco solubilizado nelas vai apresentar maiores concentrações na pele e, conseqüentemente, maior penetração no tecido. A combinação do aumento do coeficiente de difusão do fármaco através da pele e o aumento da solubilidade do fármaco na pele também pode ocorrer de formar sinérgica (MOSER et al., 2001).

O grau de saturação do fármaco na formulação pode ser modificado aumentando-se a concentração ou diminuindo a solubilidade do mesmo no veículo (formulação). Estas medidas aumentam a atividade termodinâmica do fármaco na formulação e, conseqüentemente, aumenta a permeação na pele (SANTOS et al., 2011).

2.6 Modelos de penetração e/ou permeação cutânea *in vitro*

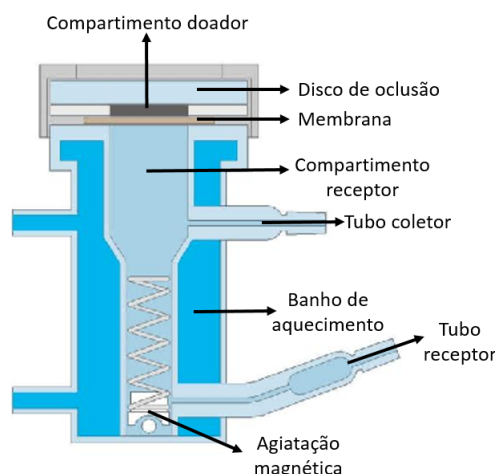
Os modelos de penetração e/ou permeação cutânea *in vitro* utilizados para avaliação de fármacos aplicados por via tópica utilizam dispositivos de difusão vertical. A célula de difusão de Franz é o modelo mais utilizado deste tipo de sistema de difusão vertical (FRANZ, 1975; FRIEND, 1992; NG et al., 2010).

A célula de Franz é composta por um compartimento doador e receptor separados por uma membrana, que pode ser biológica (pele) ou sintética (acetato de celulose), por exemplo. O compartimento receptor deve fornecer condições *sink* para que haja difusão constante do fármaco a partir do meio doador em direção ao meio receptor. Para compostos hidrofílicos, o meio receptor composto por solução tampão em pH fisiológico é suficiente para atender às condições *sink*, no entanto, para fármacos lipofílicos é necessário, em alguns casos, a utilização de aditivos que promovam maior solubilidade do mesmo no meio receptor, como por exemplo, etanol, metanol, ciclodextrina, tensoativos. No entanto, deve-se utilizar tensoativos e solventes orgânicos com cautela, pois podem danificar a pele e, conseqüentemente, sua característica de atuar como barreira à permeação. A temperatura

da célula é controlada por um banho-maria termostático com o objetivo de manter a temperatura próximo à temperatura fisiológica da pele (32 °C) (MOSER et al., 2001; BRONAUGH; HOWARD I. MAIBACH, 1999).

A Figura 14 apresenta o desenho esquemático de uma célula de difusão vertical do tipo Franz.

Figura 14 – Desenho esquemático de uma célula de difusão vertical do tipo Franz.



Fonte: adaptado de <https://hansonresearch.com/diffusion-testing/vision-microette/>.

A membrana biológica constituída de tecido cutâneo humano é considerada com o padrão ouro para este tipo de ensaio *in vitro*, no entanto, a pele humana apresenta grande viabilidade entre amostras devido a diferenças entre raça, sexo, idade e local anatômico de retirada do tecido do doador (BARBERO; FRASCH, 2009). Além disto, a sua utilização envolve questões que exigem aprovação por comitê de ética para a realização de experimentos com tecido cutâneo humano. Por isso, buscam-se como substitutos à pele humana como, por exemplo, a pele de suínos, porquinhos-da-índia (*guinea pig*) e camundongos, apesar de apresentarem maior permeabilidade em comparação à pele humana (RIVIERE, 2005; MOSER et al., 2001).

A pele de suínos é amplamente utilizada, pois pode ser facilmente obtida de animais que foram abatidos para consumo humano e também porque apresentam características morfológicas semelhantes ao tecido cutâneo humano. Estudos comparativos indicaram que a permeação *in vitro* de água e de substâncias químicas, como fármacos, por exemplo, foi semelhante entre as peles de suíno e humano sob as mesmas condições experimentais. O tecido cutâneo suíno apresenta distribuição de pelos (20 pelos por cm²), espessura do estrato córneo (21–26 µm), epiderme (66–72 µm), derme e conteúdo de tecido elástico semelhante ao tecido cutâneo humano. As maiores diferenças entre os tecidos cutâneos de humanos e suínos são a vascularização e a proporção de glândulas sebáceas. A vascularização é menor no tecido suíno e a proporção de glândulas écrinas é maior no tecido humano enquanto

que nos suínos observam-se apenas glândulas apócrinas (SIMON; MAIBACH, 1982; DICK; SCOTT, 1992; GODIN; TOUITOU, 2007).

Como alternativa à pele suína, a pele de porquinho-da-índia (*guinea pig*) também pode ser utilizada, pois também apresenta correlação com a pele humana (VALIVETI et al., 2004; SUEKI et al., 2000). A pele de cobra apresenta-se também como membrana alternativa em ensaios de penetração e/ou permeação cutânea *in vitro*, pois assemelha-se ao estrato córneo do tecido cutâneo humano, apesar de não apresentar folículos (GODIN; TOUITOU, 2007).

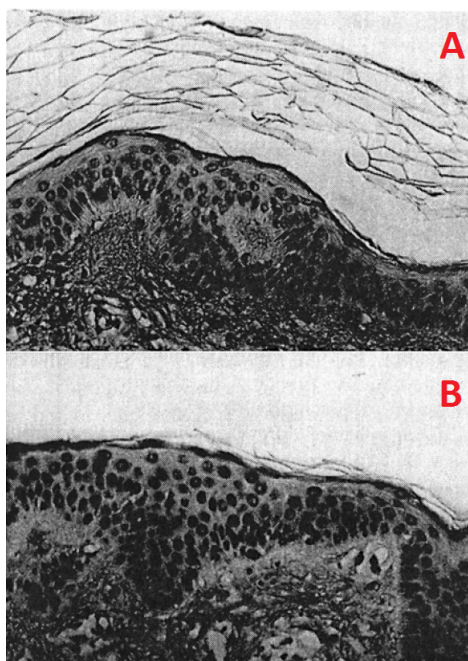
A pele a ser utilizada em modelos de penetração e/ou permeação cutânea *in vitro* pode ser utilizada na forma fresca ou congelada para posterior utilização. A pele utilizada após congelamento por um período de até 3 meses não apresenta diferença significativa da pele fresca (sem sofrer congelamento) em ensaios de penetração e/ou permeação cutânea *in vitro* (FRIEND, 1992).

A preparação da pele envolve vários processos que resultam em diferentes tipos de tecido. A pele obtida por tais processos pode se apresentar como: pele íntegra (*full thickness*), epiderme separada por calor ou estrato córneo isolado. A pele íntegra é obtida pela separação da mesma do tecido subcutâneo e a espessura apresentada após a remoção tem correlação com a penetração e/ou permeação do fármaco na pele (HEARD; SCREEN, 2008). O uso de dermatometro permite a padronização da espessura da pele, que diminui a variabilidade de resultados em experimentos *in vitro*. A técnica de separação da epiderme por calor é inadequada para tecido que contém pêlos, pois os mesmos podem provocar o surgimento de aberturas no tecido cutâneo que permitem a passagem de substâncias. O estrato córneo isolado pode ser obtido por meio de métodos químicos ou enzimáticos.

A quantificação do fármaco presente na pele como um todo ou em camadas da mesma é realizada por diversas técnicas. A técnica utilizada para quantificação do fármaco presente no estrato córneo é conhecida como *tape stripping*, que consiste na remoção progressiva do estrato córneo com o uso de fitas adesivas. A aplicação da fita sobre a pele e a posterior remoção abrupta traz consigo uma camada de estrato córneo, e o fármaco que possivelmente penetrou nesta camada, aderida à cola da fita adesiva. São realizadas várias remoções para que se alcance a completa remoção do estrato córneo da pele. A quantificação do fármaco a cada remoção pode determinar a difusão do mesmo através das camadas do estrato córneo (BRONAUGH; HOWARD I. MAIBACH, 1999).

A Figura 15 apresenta em (A) uma imagem obtida por microscopia ótica de um tecido cutâneo íntegro e em (B) após ser submetida a 50 remoções do estrato córneo através da técnica de *tape stripping*.

A permeação do fármaco através da pele e a quantificação no meio receptor é realizada em função do tempo. A quantidade cumulativa permeada é relacionada com o tempo e a permeação no estado de equilíbrio J (Equação 2.3) é calculada a partir da inclinação da reta da porção linear do perfil de permeação obtido. A interseção da reta

Figura 15 – Pele antes e após o procedimento de *tape stripping*.

Fonte: Adaptado de (BRONAUGH; HOWARD I. MAIBACH, 1999).

referente à porção linear do perfil de permeação no eixo referente ao tempo corresponde ao *lag time*, que é o tempo necessário para que ocorra o início da permeação.

2.7 Planejamento experimental

Planejamento experimental é o termo designado a um conjunto de metodologias usadas para a execução de um experimento de maneira sistemática com o objetivo de analisar, ao mesmo tempo, parâmetros de forma individual ou combinados entre si que poderão, ou não, influenciar no resultado final e obter o máximo de informações sobre os mesmos.

O planejamento experimental foi desenvolvido inicialmente na década de 1920, por Ronald Fisher, em Londres, Inglaterra. Fisher tentava determinar o efeito de fertilizantes, em diferentes áreas, no rendimento da colheita. No entanto, verificou que o rendimento da colheita não dependia apenas do fertilizante (FISHER, 1974). Outros fatores como condições do solo, uso de fertilizantes e umidade, por exemplo, exerciam influência no rendimento da colheita também. Sabendo desta relação entre os fatores (fertilizante, condições do solo, umidade) e o rendimento da colheita (resposta), Fisher utilizou o planejamento experimental para conhecer a importância de cada fator e a interação entre eles na resposta.

A partir do trabalho de Fisher, o planejamento experimental se desenvolveu sob três pilares: randomização, replicação e blocagem. E desde então, se aprimorou e tornou-se

amplamente aceito e utilizado no meio científico (ANTONY, 2003; MONTGOMERY, 2012).

As expressões fatores e respostas, abordadas no exemplo do experimento de Fisher, são utilizadas em planejamento experimental para denominar partes de um processo. Um processo é constituído de fatores, que são parâmetros alterados em diversos níveis para influenciar as respostas, que por sua vez, são variáveis que descrevem as propriedades do produto resultante do processo.

Os fatores de um planejamento experimental podem ser do tipo quantitativo ou qualitativo. Os fatores quantitativos apresentam níveis representados por valores numéricos e os fatores qualitativos pela descrição da sua identidade. Cada fator pode assumir diferentes níveis, de acordo com a sua natureza quantitativa ou qualitativa. Em um fator do tipo qualitativo, geralmente, necessitam-se de mais níveis que um fator qualitativo (ANTONY, 2003).

Em planejamentos experimentais com fatores quantitativos em dois níveis, os mesmos são representados através dos símbolos matemáticos (+) e (-) para indicar o nível máximo e mínimo, respectivamente. Quando há mais de dois níveis, o intervalo é ampliado, no entanto a representação dos níveis máximo e mínimo continua sendo os símbolos (+) e (-), respectivamente.

No processo de preparação de carreadores lipídicos, por exemplo, os fatores quantitativos podem ser a concentração lipídica, concentração de tensoativos, velocidade de agitação, ciclos de homogeneização e os fatores qualitativos podem ser diferentes tipos de lipídio e tensoativo utilizados, modelos de homogeneizador, fabricantes da matéria-prima. As respostas para este mesmo exemplo podem ser: tamanho médio de partícula, PDI, eficiência de incorporação. De acordo com as modificações realizadas nos fatores em cada nível estabelecido, podem ser obtidas diferentes respostas.

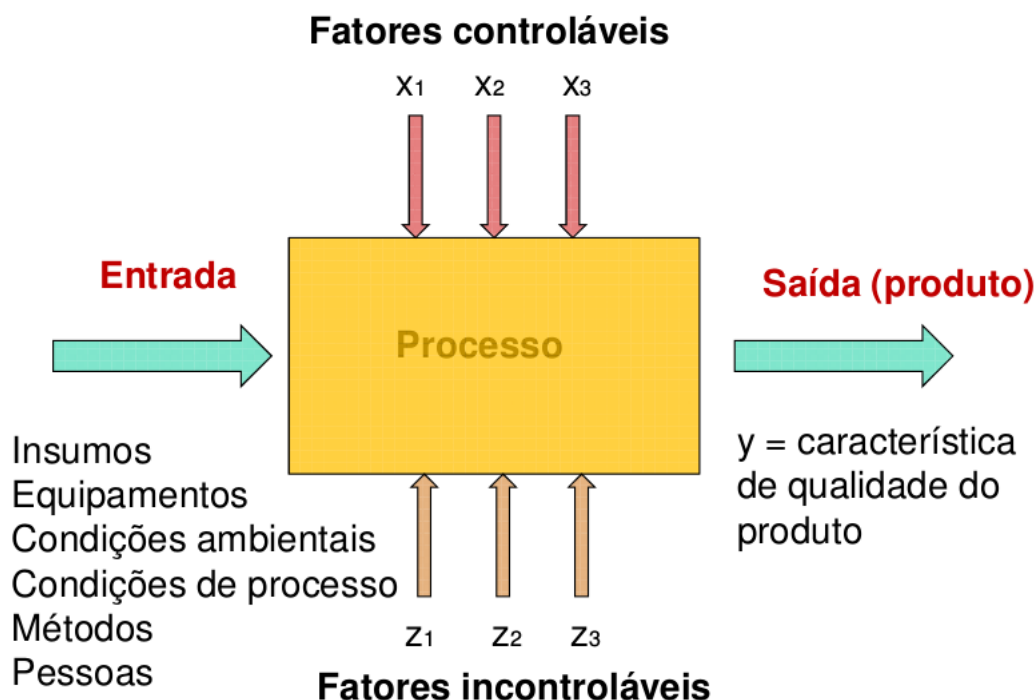
A Figura 16 apresenta o desenho esquemático de um processo hipotético e todas as etapas que o compõem. No início do processo (entrada) encontramos os fatores, que podem ser dos tipos controláveis (X_1 , X_2 e X_3) ou incontroláveis (Z_1 , Z_2 e Z_3). Na saída temos o produto, que tem suas características (y) mensuradas de acordo com as respostas avaliadas.

As etapas de execução de um planejamento experimental são apresentadas por uma matriz, que compreende o plano formal construído para conduzir o planejamento incluindo os fatores, níveis e os experimentos resultantes da combinação dos mesmos.

A ordem dos experimentos é disposta de forma aleatória para diminuir a interferência de variáveis incontroláveis (co-variáveis) e também para atender aos requisitos de métodos estatísticos que exigem que os componentes do erro experimental sejam variáveis aleatórias independentes (ANTONY, 2003).

A utilização de planejamento experimental apresenta diversas vantagens em processos de produção, que são: aumento do rendimento e estabilidade, diminuição da variabilidade

Figura 16 – Desenho esquemático de um processo hipotético e todas as etapas que o compõem.



Adaptado de (MONTGOMERY, 2012)

das características do produto, redução de custos de preparação, redução no tempo de planejamento, maior conhecimento da relação entre os fatores e respostas (ANTONY, 2003).

O planejamento experimental pode ser dividido didaticamente em duas fases: a fase pré-experimental, que apresenta grande relevância para a validade dos resultados e conclusões obtidos no término do experimento, e a fase experimental. A tabela Tabela 1 apresenta estas duas fases e as etapas necessárias, de forma ordenada, para a realização de um planejamento experimental (COLEMAN; MONTGOMERY, 2012).

Tabela 1 – Fases e etapas ordenadas para realização de um planejamento experimental.

Ordem	Etapas	Fase
1	Identificação do(s) problema(s) e determinação do(s) objetivo(s)	Pré-experimental
2	Seleção do(s) fator(es) e intervalo entre os níveis	
3	Seleção da(s) resposta(s) para avaliação	
4	Escolha do tipo de planejamento experimental a ser usado	
5	Realização dos experimentos	Experimental
6	Análise estatística dos dados obtidos	
7	Conclusões e recomendações de ação/correção	

Fonte: Adaptado de: (MONTGOMERY, 2012; FAROOQ et al., 2015).

Para conduzir um planejamento experimental de forma eficiente deve-se executar

uma sequencia de etapas.

A primeira etapa, na fase pré-experimental, é a identificação do(s) problema(s) ou dúvida(s) que deve(m) ser solucionado(s) e a determinação do(s) objetivo(s) do experimento, e para isso, deve-se conhecer o processo de forma adequada e saber quais as respostas são relevantes para a finalidade do produto obtido no processo (FAROOQ et al., 2015). A segunda etapa da fase pré-experimental é a identificação do(s) fature(s) e a definição dos intervalos a serem utilizados entre os níveis mínimo e máximo no planejamento experimental.

Para a identificação dos fatores são utilizadas metodologias como o diagrama de causa-efeito, que realizam um levantamento de todos os fatores que podem influenciar nas características do produto final do processo e, através de uma análise baseada em parâmetros técnicos e científicos, são selecionados os que foram identificados como mais relevantes para o planejamento experimental (FAROOQ et al., 2015).

Durante a etapa de seleção dos fatores, é importante identificar co-variáveis, ou fatores de ruído, que podem afetar as repostas do processo. Estes fatores podem ser a umidade do ar, diferentes lotes da mesma matéria-prima, execução do experimento em dias diferentes. Os efeitos destes fatores podem ser combatidos através de métodos de blocagem e análise estatística de co-variância e robustez (MONTGOMERY, 2012).

Após a identificação dos fatores que serão utilizados no planejamento experimental, é necessário determinar o intervalo utilizado entre os níveis mínimo e máximo de cada fator. Este intervalo é selecionado de acordo com conhecimentos teóricos e práticos obtidos sobre o processo, e também, através de experimentos preliminares.

A terceira etapa é a escolha das respostas que serão avaliadas. Esta escolha deve ser baseada nas características que refletem a aplicação pretendida para o produto resultante do processo. As medidas das respostas são obtidas através de metodologias que informam características específicas e, por isso, deve-se ter confiança na metodologia utilizada e assegurar-se que as medidas das respostas serão exatas, precisas e, principalmente, reproduzíveis (ANTONY, 2003).

A escolha do tipo de planejamento experimental a ser utilizado é a quarta etapa. Existem vários tipos de planejamentos experimentais e, individualmente, possuem características que se adéquam ao objetivo do estudo em questão.

A escolha do tipo de planejamento envolve questões como: a quantidade de experimentos que serão realizados, a ordem dos experimentos, a necessidade de realizar os experimentos em blocos, os custos financeiros envolvidos na execução, as interações entre os fatores e a resolução do planejamento (MONTGOMERY, 2012).

A fase experimental inicia-se na quinta etapa e se estende até o termino do planejamento. A quinta etapa é a execução do experimento em si, que consiste em uma série de testes que irão investigar a hipótese.

A sexta etapa é a de análise das respostas, na qual serão utilizados modelos

estatísticos para tratamento dos dados obtidos no experimento e a interpretação dos mesmos.

A última etapa consiste na conclusão e recomendações de ação/correção. Nesta etapa a nulidade da hipótese que motivou o experimento será verificada e, baseado no resultado, ocorrerá a tomada de ação para a modificação no processo que resultará na melhor resposta para o produto obtido no processo (ANTONY, 2003).

2.7.1 Planejamento fatorial fracionado

A principal característica do planejamento fatorial fracionado é executar uma fração do número de experimentos que um planejamento fatorial completo realizaria em um mesmo processo. Esta característica é muito útil, pois gera economia de recursos e tempo. A aplicação deste tipo de planejamento experimental ocorre quando há interesse de explorar, dentre vários fatores, quais exercem efeito significativo em uma determinada resposta, que pode ser positiva (aumento da resposta) ou negativa (diminuição da resposta) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2012).

Um planejamento fatorial completo 2^5 , com cinco fatores e dois níveis, resulta em uma matriz de 32 experimentos. No entanto, um fatorial fracionado 2^{5-1} , do tipo fração $\frac{1}{2}$, resulta em metade dos experimentos do fatorial completo 2^5 , ou seja, 16 experimentos. A redução do número de experimentos em um planejamento fatorial fracionado de dois níveis em relação a um fatorial completo pode ser correspondente a metade ($\frac{1}{2}$), um quarto ($\frac{1}{4}$), um oitavo ($\frac{1}{8}$) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A notação utilizada para identificar um planejamento fatorial fracionado é 2^{k-p} , onde o número de experimentos realizados no fatorial fracionado é determinado pela fração $\frac{1}{2^p}$ de um fatorial completo 2^k , onde k é a quantidade de fatores do fatorial fracionado e p é a fração ($\frac{1}{2^p}$) referente ao fatorial completo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; COLLINS; DZIAK; LI, 2009).

O fatorial fracionado 2^{5-1} , por exemplo, corresponde à fração ($\frac{1}{2}$) de um fatorial completo 2^5 , pois o valor de p é $\frac{1}{2^p} = \frac{1}{2^1} = \frac{1}{2}$. Seguindo o mesmo raciocínio, o fatorial fracionado 2^{5-2} corresponde à $\frac{1}{4}$ do fatorial completo 2^5 , pois o valor de p é ($\frac{1}{2^p} = \frac{1}{2^2} = \frac{1}{4}$).

A diferença principal entre os fatoriais fracionado e completo, além da diminuição da quantidade de experimentos a serem executados, é o impedimento de se estimar os efeitos dos fatores individualmente no fatorial fracionado, pois os efeitos principais se confundem com efeitos de ordens maiores gerando padrões de confundimento. Entretanto, estes padrões, geralmente, não comprometem significativamente as conclusões obtidas a partir da análise dos resultados. As interações entre fatores são classificadas por ordens, por exemplo, interação de dois fatores corresponde à segunda ordem, três fatores corresponde à terceira ordem, e assim por diante (MONTGOMERY, 2012).

A confiabilidade dos resultados obtidos em fatoriais fracionados está baseada em um princípio estatístico conhecido como dispersão de efeitos, ou efeitos esparsos, que

ocorre em planejamentos experimentais contendo diversos fatores. Este princípio determina que somente 20 % dos efeitos principais e interações de dois fatores (segunda ordem) são significativos para a resposta de um processo, ou seja, as interações de alta ordem (interações maiores que terceira ordem) apresentam efeitos insignificantes e, por isso, não possuem importância prática (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; MONTGOMERY, 2012).

O padrão de confundimento é instituído por uma relação geradora, que dá origem ao fator gerador utilizado para elaboração da matriz de experimentos, que por sua vez, vai determinar a resolução do fatorial fracionado (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; ANDERSON; WHITCOMB, 2000; LUNDSTEDT et al., 1998; CHAKRABORTY et al., 2009). A Tabela 2 apresenta as resoluções mais utilizadas e os padrões de confundimento entre os efeitos.

Tabela 2 – Padrões de confundimento de planejamentos experimentais de resolução III, IV e V.

Resolução	Padrão de confundimento
Resolução III	Efeitos principais são confundidos com efeitos de interações de segunda ordem.
Resolução IV	Efeitos principais são confundidos com efeitos de interações de terceira ordem e efeitos de interações de segunda ordem são confundidas entre si.
Resolução V	Efeitos principais são confundidos com efeitos de interação de quarta ordem e os efeitos de interação de segunda ordem são confundidos com efeitos de interação de terceira ordem.

Fonte: Produzido pelo autor.

A elaboração da matriz de um fatorial fracionado se dá, primeiramente, através da elaboração das colunas correspondentes a um planejamento completo $2^{(k-p)}$, onde k é a quantidade de fatores do fatorial fracionado e p é o tipo de fração do mesmo e, posteriormente, as colunas restantes são constituídas de acordo com o fator gerador obtido a partir da relação geradora. Os fatoriais fracionados com $p = 1$ e $p = 2$ apresentam um e dois fatores geradores, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta a matriz de um planejamento fracionado 2_{III}^{3-1} do tipo fração meia, resolução três e formado por três fatores (A, B e C), onde a matriz de experimentos do mesmo foi confeccionada a partir de uma matriz de planejamento completo 2^2 dos fatores A e B, e o fator C, definido pelos contrastes da interação AB, de acordo com a relação geradora $I=ABC$.

O padrão de confundimento apresentado pelo fatorial fracionado 2_{III}^{3-1} pode ser observado na Tabela 4.

Observa-se que neste tipo de planejamento, de resolução III, os efeitos principais são confundidos com interações de segunda ordem, que configura um padrão de confundimento de difícil interpretação, pois ambos são considerados interações de pequena ordem. Os

Tabela 3 – Matriz de um planejamento fracionado 2_{III}^{3-1} , I=ABC.

Experimento	Fatorial 2^2		Fatorial 2_{III}^{3-1}		
	A	B	A	B	C=AB
1	-	-	-	-	+
2	+	-	+	-	-
3	+	+	-	+	-
4	+	+	+	+	+

Fonte: Produzido pelo autor.

planejamentos de resolução III devem ser evitados o máximo possível devido a possibilidade de inferência equivocada de efeito significativo a um determinado fator.

Desse modo, o responsável pelo desenvolvimento do planejamento deve ter certeza que as interações entre efeitos principais e interações de segunda ordem são desprezíveis para que haja confiança nos resultados obtidos (ABRAHAM; CHIPMAN; VIJAYAN, 1999; BRERETON, 2003).

Tabela 4 – Padrões de confundimento de um planejamento fracionado 2_{III}^{3-1} .

Fatores	Padrões de confundimento
A	A + BC
B	B + AC
C	C + AB

Fonte: Produzido pelo autor.

Os planejamentos experimentais fracionados de resolução III são conhecidos como saturados. Neste tipo de planejamento existem n experimentos para $n - 1$ fatores e a quantidade de experimentos (n) devem ser múltiplos de 4, por exemplo, 3 fatores com 4 experimentos, 7 fatores com 8 experimentos. Um exemplo deste tipo de planejamento é o Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946).

O planejamento fracionado 2_{IV}^{6-2} de resolução IV, equivalente a um quarto ($\frac{1}{4}$) de um planejamento completo, apresenta duas relações geradoras. A Tabela 5 apresenta um exemplo de matriz de experimentos de um fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2} com relações geradoras I=ABCE e I=BCDF.

As relações geradoras correspondem ao número de colunas adicionais ao fatorial completo de partida para construção da matriz do fatorial fracionado (colunas referentes aos contrastes E=ABC e F=BCD da Tabela 5). Desta forma, a matriz do fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2} será construída a partir de um fatorial completo 2^4 ($2^{k-p} = 2^{(6-2)} = 2^4$) e os contrastes

Tabela 5 – Matriz de um planejamento fracionado 2_{IV}^{6-2} com fatores geradores I=ABCE e I=BCDF.

Experimento	Fatorial 2_{IV}^{6-2}					
	A	B	C	D	E=ABC	F=BCD
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	-	+
5	-	-	+	-	+	+
6	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	+	+
11	-	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-
13	-	-	+	+	+	-
14	+	-	+	+	-	-
15	-	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+

Fonte: Produzido pelo autor.

dos k -ésimos fatores da matriz serão identificados de acordo com as relações geradoras E=ABC e F=BCD. A relação geradora completa é I=ABCE=BCDF=ADEF.

Os padrões de confundimento para cada efeito ou interação de efeitos são determinados multiplicando-se os mesmos pela relação geradora (I=ABCE=BCDF=ADEF). Pode-se observar na Tabela 6 os padrões de confundimento de um fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2} , de resolução IV, e verificar o confundimento do efeito principal A com os de terceira ordem BCE e DEF.

2.7.2 Planejamento composto central

O planejamento composto central foi desenvolvido inicialmente por Box e Wilson (1951) e é classificado como um planejamento de superfície de resposta. Este tipo de planejamento experimental se propõem a determinar a região, no intervalo entre os níveis dos fatores, que direciona para a melhor resposta possível, de acordo com a(s) característica(s) desejada(s) para o resultado de um processo (BOX, 1999).

Através de planejamentos experimentais de superfície de resposta é possível avaliar as respostas produzidas pelos fatores em um região definida, realizar inferências estatísticas para verificar a sensibilidade de uma resposta frente a mudança de nível de um fator de

Tabela 6 – Padrões de confundimento de um planejamento fracionado 2^{6-2}_{IV} .

Fatores	Padrões de confundimento
A	A + BCE + DEF
B	B + ACE + CDF
C	C + ABE + BDF
D	D + AEF + BCF
E	E + ABC + ADF
F	F + ADE + BCD
AB	AB + CE
AC	AC + BE
AD	AD + EF
AE	AE + BC + DF
AF	AF + DE
BD	BD + CF
BF	BF + CD
ABD	ABD + ACF + BEF + CDE
ABF	ABF + ACD + BDE + CEF

Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: As interações maiores que terceira ordem, obtidas a partir da relação de definição (I=ABCE=BCDF=ADEF) foram omitidas

interesse e estimar os níveis ótimos dos fatores de uma determinada resposta (MASON; GUNST; HESS, 2003).

Este tipo de planejamento elabora uma função matemática, denominada função resposta, que estima a resposta de um ou mais fatores no intervalo determinado para os níveis dos mesmos. Uma representação geral desta função está demonstrada na Equação 2.4, onde y é a resposta e x_1, x_2, \dots, x_k são os níveis dos fatores de interesse (MASON; GUNST; HESS, 2003).

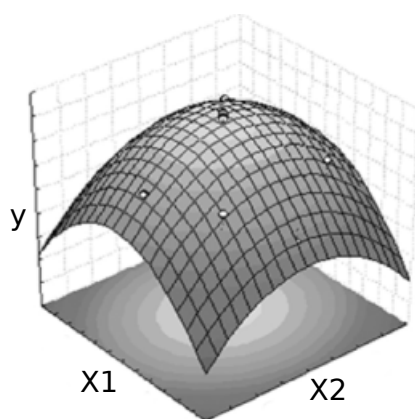
$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (2.4)$$

O tipo de função f será definido por meio de análise de correlação dos resultados do planejamento com modelos matemáticos. Através da equação é possível resumir os resultados obtidos no planejamento experimental e presumir as respostas dentro do intervalo de níveis do fator. A função matemática obtida é representada graficamente por meio de uma curva denominada superfície de resposta. Esta curva pode ser apresentada em uma

dimensão, quando há apenas um fator de interesse, ou em duas dimensões, quando existem dois fatores de interesse. As curvas de superfície de resposta apresentam informações importantes sobre as características de um processo, principalmente, quanto à região de níveis ótimos para a resposta de interesse (MASON; GUNST; HESS, 2003).

O gráfico de superfície de resposta pode apresentar formas diferentes de acordo com o tipo de função obtida, que podem ser do tipo linear e quadrática. Se a função obtida é quadrática, por exemplo, a representação gráfica da curva será similar a exibida na Figura 17. Onde x_1 e x_2 são os fatores e y a resposta (LUNDSTEDT et al., 1998).

Figura 17 – Representação gráfica de uma função quadrática de dois fatores em três dimensões.



Fonte: adaptado de (RUFINO et al., 2009).

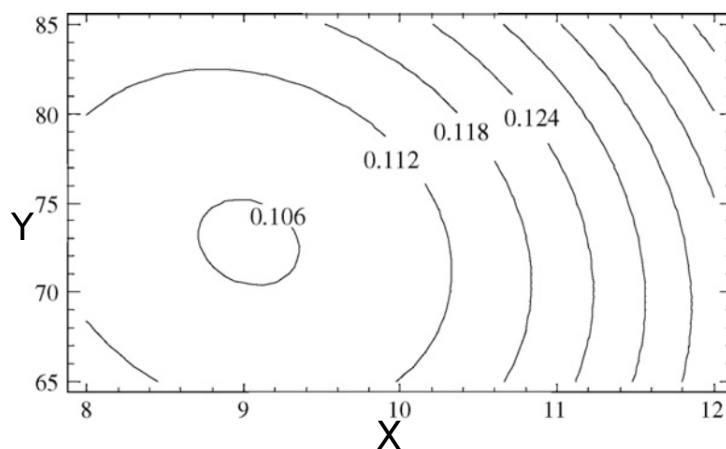
Além do gráfico em três dimensões exibido pela Figura 17 pode-se expor graficamente a superfície de resposta por meio de gráficos de contorno (*contour plots*). Estes gráficos apresentam a relação entre três variáveis em duas dimensões, onde duas variáveis ocupam os eixos x e y e a terceira variável, z .

A Figura 18 apresenta um exemplo de gráfico de contorno onde observa-se os valores de polidispersão de tamanho (resposta) de uma dispersão de CLN em função de dois fatores, x e y (ARAÚJO et al., 2010).

Durante a elaboração de um planejamento experimental de superfície de resposta deve-se utilizar os fatores em no mínimo três níveis, porque a utilização de apenas dois níveis resulta, obrigatoriamente, na representação gráfica de uma reta (MASON; GUNST; HESS, 2003).

O planejamento composto central é constituído por um planejamento fatorial completo de dois níveis acrescido de pontos centrais e um grupo de pontos axiais, ou pontos em estrela. Dividindo-o em três partes temos: uma parte fatorial (cúbica), uma parte axial (estrela) e um ponto central com n repetições. A quantidade de pontos axiais corresponde a 2^k , onde k é o número de fatores do planejamento. Essa organização dos níveis dos fatores permite ao planejamento composto central fazer estimativa de uma curvatura.

Figura 18 – Representação gráfica de uma função quadrática de dois fatores em duas dimensões.



Fonte: adaptado de (ARAÚJO et al., 2010).

Mesmo com o incremento de experimentos provocado pelo acréscimo de pontos axiais e centrais em um planejamento composto central 2^k , o número de experimentos é menor que um fatorial completo com três níveis 3^k (MASON; GUNST; HESS, 2003).

A determinação da quantidade de experimentos de um planejamento de composição central pode ser realizada pela Equação 2.5. Onde n é o número de experimentos, k é o número de fatores e m corresponde às repetições do ponto central. Dessa forma, um planejamento composto central 2^3 , com três repetições do ponto central, será efetuado em 17 experimentos, enquanto que um planejamento fatorial completo 3^3 , 27 experimentos.

$$n = 2^k + 2k + m \quad (2.5)$$

A distância do ponto central para os pontos axiais é representada pela letra grega α . O valor de α depende das propriedades desejadas para o planejamento e também dos fatores envolvidos no processo. Planejamentos compostos centrais que apresentam $\alpha = F^{\frac{1}{4}}$, onde F é a quantidade de pontos fatoriais (forma cubica), são denominados planejamentos rotacionados, entretanto, se $\alpha = 1$ o planejamento é denominado planejamento de face centrada. A diferença básica entre o planejamento rotacionado e o de face centrada está na característica de rotacionalidade. Um planejamento é dito rotacionado quando a variância da resposta prevista em qualquer ponto x depende apenas da distância de x do ponto de central (MONTGOMERY, 2012).

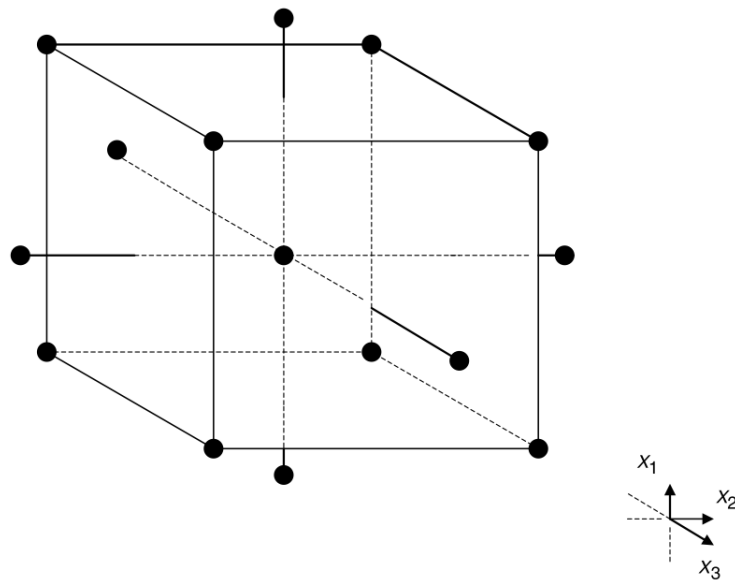
Observa-se em planejamentos compostos centrais rotacionados que os pontos fatoriais e axiais são equidistantes do ponto central e ao serem ligados entre si formam uma circunferência. Por outro lado, no planejamento composto central de face centrada apenas os pontos axiais são equidistantes do ponto central e, conseqüentemente, não é possível ligá-los aos pontos fatoriais para formar uma circunferência (MASON; GUNST; HESS,

2003).

A quantidade de níveis de cada fator também é diferente para o planejamento rotacionado e o de face centrada, pois o rotacionado apresenta cinco níveis e o de face centrada, apenas três. (MASON; GUNST; HESS, 2003).

Os pontos axiais dispostos equidistantes do ponto central nos planejamentos compostos centrais rotacionados e de face centrada promovem a orientação do planejamento para várias direções, de forma que facilita a exploração dos níveis para estabelecer uma curvatura (MASON; GUNST; HESS, 2003). A Figura 19 apresenta a organização espacial dos pontos fatoriais, axiais e central de um planejamento composto central rotacionado para três variáveis com $\alpha = F^{\frac{1}{4}} = 8^{\frac{1}{4}} = 1,68$.

Figura 19 – Ilustração dos pontos fatoriais, axiais e central de um planejamento composto central para 3 variáveis.



Fonte: adaptado de (MASON; GUNST; HESS, 2003).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo o fármaco dexametasona, avaliar a cinética de liberação e realizar estudos de penetração e/ou permeação cutânea.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a densidade, viscosidade dinâmica e cinemática do óleo de pracaxi.
- Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerido para preparação de emulsões de óleo de pracaxi.
- Verificar a ocorrência e identificar a região referente à emulsões e nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário contendo óleo de pracaxi, mistura de tensoativos e água deionizada.
- Avaliar o comportamento térmico e a organização das estruturas cristalinas da cera de carnaúba e de misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.
- Desenvolver e validar metodologia analítica em HPLC para quantificação de DXM em CLN e matriz biológica (pele de orelha de porco).
- Determinar a solubilidade da DXM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, água e óleo de pracaxi.
- Determinar o coeficiente de partição ($\log P$) da DXM em óleo de pracaxi/água.
- Realizar planejamento experimental fracionado e composto central para determinar a formulação de CLN com as características de menor tamanho e PDI, e maior eficiência de incorporação de DXM.
- Estabelecer o perfil e modelo cinético melhor ajustado ao dado de cinética de liberação *in vitro* da DXM em membrana de acetato de celulose.
- Avaliar a penetração e/ou permeação cutânea *in vitro* da DXM em pele de orelha de porco da DXM contida em CLN.

4 Material e métodos

4.1 Material

- Cera de carnaúba tipo I, Tween 80[®], Span60[®]. trifluoreto de boro (BF₃), padrões de ácidos graxos (araquidônico, behênico, cáprico, láurico, capríco, lignocérico, mirístico, caprílico, palmítico e esteárico) e ácido trifluoroacético (C₂HF₃O₂) obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Óleo de pracaxi obtido da Amazon Oil (Belém, Brasil).
- Dexametasona obtida da DEG (São Paulo, Brasil).
- Metanol e acetonitrila grau HPLC obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Fosfato de potássio (KOH), cloreto de sódio (NaCl), propilenoglicol e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) obtidos da Synth[®] Brasil (Diadema, Brasil).
- n-Heptano (H₃C(CH₂)₅CH₃) P.A obtido da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Brasil).
- Fita adesiva 3M[®] (Sumaré, Brasil), modelo Durex[®] Transparente.

4.2 Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo gasoso acoplado a detector de chama (FID)
- Cromatógrafo líquido Waters[®] (Miliford, EUA) modelo Alliance e2625 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters[®] modelo 2998 (Miliford, EUA).
- Viscosímetro rotacional Anton Paar SVM 3000 (Graz, Austria).
- Agitador mecânico de pás
- Manta aquecedora para béquer de 250 mL Arsec Equipamentos para Laboratório (Vargem Grande Paulista, Brasil).
- Placa agitadora magnética
- Medidor de pH Hanna[®] modelo HI 2210 (Tamboré, Brasil).
- Centrifuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão).
- Sonda de ultrassom Vibra Cell (Branson, USA).
- Banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil).
- Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu[®] modelo DSC-60 Plus (Quioto, Japão).

- Difratômetro de raios-X Bruker[®] modelo D8 Advance (Billerica, EUA).
- Ultraturrax IKA[®] modelo T25 (Campinas, Brasil).
- Homogeneizador GEA[®] Niro Soavi modelo Panda 2K NS1001L (Parma, Itália).
- Banho-maria ultratermostatizado Adamo modelo LM-80 (São Paulo, Brasil).
- Coluna C-18, de fase reversa, Waters[®] (Miliford, EUA) modelo *XBridge*[™] com dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130 Å, tamanho de partícula de 3,5 µm e área de superfície de 185 m²/g.
- Pré-coluna Waters[®] (Miliford, EUA), de 20 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130 Å, tamanho de partícula de 3,5 µm e área de superfície de 185 m²/g .
- Sistema de purificação de água Merck-Millipore[®] modelo Milli-Q[®] (Darmstadt, Alemanha).
- Balança analítica Shimadzu[®] modelo AY 220 (Kyoto, Japão).
- Filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Millex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 µm.
- Agitador para tubos do tipo vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil).
- Analisador de tamanho e potencial zeta Malvern[®] modelo Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra).
- Dispositivos de ultrafiltração Sartorius modelo Vivaspin[®] 2 (Goettingen, Alemanha) com membrana de polietersulfona (PES) e *cut-off* de 10 Kda.
- Grade de cobre para microscopia eletrônica de transmissão grade revestida com filme de Formvar[®].
- Microscópio eletrônico de transmissão Tecnai[®] modelo G2 Spirit Biotwin (Hillsboro, EUA).
- Células de difusão vertical do tipo Franz acopladas ao sistema automatizado Hanson Vision[®] MICROETTE[™] Plus (Chatsworth, EUA).
- Membranas de acetato de celulose com *molecular weight cut-off* (MWCO) entre 12000 e 14000 Fisher Scientific[®] (Pittsburgh, EUA).

4.3 Métodos

4.3.1 Caracterização físico-química do óleo de pracaxi

4.3.1.1 Composição de ácidos graxos

Primeiramente foram obtidos os ésteres metílicos de ácidos graxos (abreviado como FAME, do inglês *fatty acid methyl ester*) dos ácidos graxos presentes no óleo de pracaxi através da reação de derivatização. A massa de 25 mg de amostra foi devidamente pesada em tubo de ensaio fechado e homogeneizada em 1,5 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100 °C durante 10 minutos e resfriada em banho de gelo durante 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2,5 mL de solução metanólica de trifluoreto de boro (BF₃) 14 % e o tubo de ensaio novamente fechado. Este foi então aquecido novamente a 100 °C durante 30 minutos.

Após o aquecimento, a amostra foi resfriada em temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 2,5 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) 1 % e 3 mL de n-Heptano (H₃C(CH₂)₅CH₃).

A solução obtida foi transferida para tubo plástico Falcon[®] e centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante, contendo a fase orgânica, foi retirado e adicionado uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). Por ultimo, a amostra foi armazenada em frasco ambar sob refrigeração (4 °C) até a análise.

Os FAMEs foram analisados por cromatografia gasosa em coluna capilar (30 m × 0,25 mm) acoplado a detector de ionização de chama. A programação da análise foi: temperatura de coluna iniciando em 80 °C até 250 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, temperatura do injetor de 200 °C e do detector de 250 °C. O gás de arraste foi o hélio (He) a um fluxo de 1 mL/min.

Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem relativa de cada pico de ácido graxo encontrado na amostra, calculados a partir da área total dos picos do cromatograma. A identificação foi feita por comparação do tempo de retenção relativa (*k'*) de padrões analíticos de ácidos graxos previamente derivatizados em FAME e submetidos às mesmas condições cromatográficas.

4.3.1.2 Densidade, viscosidade dinâmica e cinemática

Para a obtenção dos valores de densidade, viscosidade dinâmica e viscosidade cinemática foi utilizado um viscosímetro rotacional Anton Paar SVM 3000 (Graz, Austria), que utiliza o princípio de medição Stabinger com termostato Peltier para determinação da viscosidade dinâmica e do tubo-U oscilante (*oscilating U-tube principle*) para determinação da densidade e, conseqüentemente, a viscosidade cinemática. Com este equipamento não há necessidade de preparo prévio da amostra. A metodologia utilizada para obtenção dos resultados segue o padrão ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D7042 e

D445 (ASTM, 2013b; ASTM, 2013a).

A amostra de óleo de pracaxi foi analisada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em duas etapas: inicialmente promove-se a análise em temperaturas que variaram entre 40 °C e 100 °C com intervalos de 10 °C para cada verificação e, posteriormente, uma nova amostra de óleo foi aquecida previamente em estufa a 100 °C durante 1 hora e, em seguida, procedeu-se a análise nas mesmas condições da primeira etapa. Os ensaios foram realizados em triplicata e cerca de 30 mL de óleo de pracaxi, divididos em amostras de 4 mL para cada ensaio em determinada temperatura, foram utilizados.

4.3.1.3 Determinação do EHL requerido para o óleo de pracaxi em emulsões com Tween® 80 e Span® 60

Para determinação do EHL requerido (EHL_{req}) para o óleo de pracaxi, foram preparadas 10 emulsões com diferentes proporções de dois tensoativos, um hidrofílico (EHL alto) e outro lipofílico (EHL baixo). Os tensoativos utilizados foram Tween® 80 (EHL 15) e Span® 60 (EHL 4,7).

A fase aquosa foi composta por água e tensoativo hidrofílico (Tween® 80) e a fase oleosa por óleo de pracaxi e tensoativo lipofílico (Span® 60). A composição da emulsão foi de: tensoativos 5 % (p/p), óleo de pracaxi 10 % (p/p) e água deionizada 85 % (p/p).

As proporções de tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para obtenção de cada valor de EHL requerido foi calculada de acordo com a Equação 4.1 (KIM et al., 2014; ICI AMERICAS, 1984; GRIFFIN, 1949).

$$EHL_{req} = \frac{(\%Tens_A \times EHL_A) + (\%Tens_B \times EHL_B)}{100} \quad (4.1)$$

Onde $\%Tens_A$, EHL_A , $\%Tens_B$ e EHL_B são a porcentagem e EHL do tensoativo A (Tween® 80) e a porcentagem e EHL do tensoativo B (Span® 60), respectivamente.

A Tabela 7 apresenta as proporções e valores de EHL dos tensoativos utilizados para preparar as emulsões utilizadas na determinação do EHL requerido para o óleo de pracaxi. O intervalo de EHL utilizado variou entre 5,73 e 15.

As emulsões foram preparadas pelo método de emulsificação por inversão de fases. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas a 75 °C separadamente. Em seguida, verteu-se a fase aquosa na fase oleosa, mantendo o aquecimento a 75 °C, sob agitação constante em agitador mecânico de pás a 700 rpm durante 5 minutos. A emulsão recém-obtida foi retirada do aquecimento e mantida em agitação até alcançar temperatura ambiente e, em seguida, permaneceu em repouso durante 24 horas (OLIVEIRA, 2008; PEREIRA, 2008; AULTON, 2005).

Após o período de repouso, observou-se visualmente a aparência das emulsões obtidas com o objetivo de verificar sinais de instabilidade evidenciados por ocorrência de separação de fases ou cremagem.

Tabela 7 – Proporções de tensoativos e respectivos valores de EHL.

Emulsão	Span [®] 60 (%)	Tween [®] 80 (%)	EHL
1	90	10	5,73
2	80	20	6,76
3	70	30	7,79
4	60	40	8,82
5	50	50	9,85
6	40	60	10,88
7	30	70	11,91
8	20	80	12,94
9	10	90	13,97
10	0	100	15

Fonte: Produzido pelo autor.

4.3.1.3.1 Análise macroscópica e índice de cremagem

A presença de separação de fases ou cremagem são indicativos da instabilidade do sistema. Tal análise foi feita visualmente por um período de 28 dias após preparação da emulsões (24 horas, 7 dias, 14 dias e 28 dias).

Uma alíquota de 10 mL de cada emulsão foi armazenada em tubos de ensaio e mantida em temperatura ambiente 25 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Em intervalo de tempo predeterminado, a camada de instabilidade (separação de fases ou cremagem) foi medida com auxílio de uma régua e o índice de cremagem foi calculado de acordo com a Equação 4.2 (FERREIRA et al., 2010; MACEDO et al., 2006).

$$IC = \frac{Vc}{Vte} \quad (4.2)$$

Onde IC é o índice de cremagem, Vc é o volume correspondente à cremagem e Vte é o volume total de emulsão.

4.3.1.3.2 Análise de pH

Previamente foi realizada uma diluição da emulsão em água (1:9) e, em seguida, o valor de pH foi verificado em medidor de pH Hanna[®] modelo HI 2210 (Tamboré, Brasil). As medidas de pH foram realizadas 24 horas após a preparação das emulsões e após o término do ciclo gelo-degelo.

4.3.1.3.3 Avaliação da estabilidade preliminar

Para avaliação da estabilidade preliminar as amostras foram submetidas aos testes de centrifugação em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão) e ciclo gelo-degelo em refrigerador e banho-maria termostático, respectivamente. A centrifugação foi realizada em amostras de 4 mL de cada formulação distribuídas em tubos de ensaio e submetidas a ciclos de centrifugação de 15 minutos em temperatura ambiente a 500, 1500, 2000 e 3500 rpm, respectivamente.

O ciclo gelo-degelo também foi realizado em amostras de 4 mL, que foram submetidas a seis ciclos gelo-degelo. Cada ciclo consistiu na permanência da amostra em temperatura de 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 48 horas seguido de novo período de 48 horas a 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). As observações quanto à existência de separação de fases e as determinações de pH foram realizadas antes do início do primeiro ciclo e ao final do sexto ciclo.

4.3.1.4 Diagrama de fases pseudoternário

A construção do diagrama de fases pseudoternário foi realizada por meio da metodologia de titulação com água deionizada (SARFARAZ et al., 2016; GOINDI; NARULA; KALRA, 2015; CHOUDHURY et al., 2014; FERREIRA et al., 2010; SHEN; ZHONG, 2006).

O óleo de pracaxi e a mistura de tensoativos na proporção definida no experimento descrito na subseção 4.3.1.3 foram misturados em 9 proporções diferentes (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1), acondicionados em recipientes de vidro e dispersos após sucessivas adições de água deionizada. Totalizando 99 preparações.

As misturas de óleo/tensoativos (10 g) foram aquecidas a 40-50°C e, em seguida, diluídas com quantidades crescentes de água deionizada (0,8 mL a 33 mL). Após cada diluição, as dispersões foram sonicadas em sonda de ultrassom Vibra Cell (Branson, USA) durante 90 segundos e, em seguida, submetidas a banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil) por 120 segundos à temperatura ambiente.

Por ultimo, foram inspecionadas macroscopicamente e classificadas de acordo com o estado físico (semi-sólida, líquida), cor (leitosa, opaca, turva), e tipo de dispersão (emulsão, microemulsão, separação de fases). Os resultados da inspeção visual das formulações foram plotados em um gráfico de contorno e representadas por áreas divididas de acordo com a classificação recebida (estado físico, cor e tipo de dispersão). O *software* Origin[®] versão 8.5 (Northampton, EUA) foi utilizado para obtenção do gráfico.

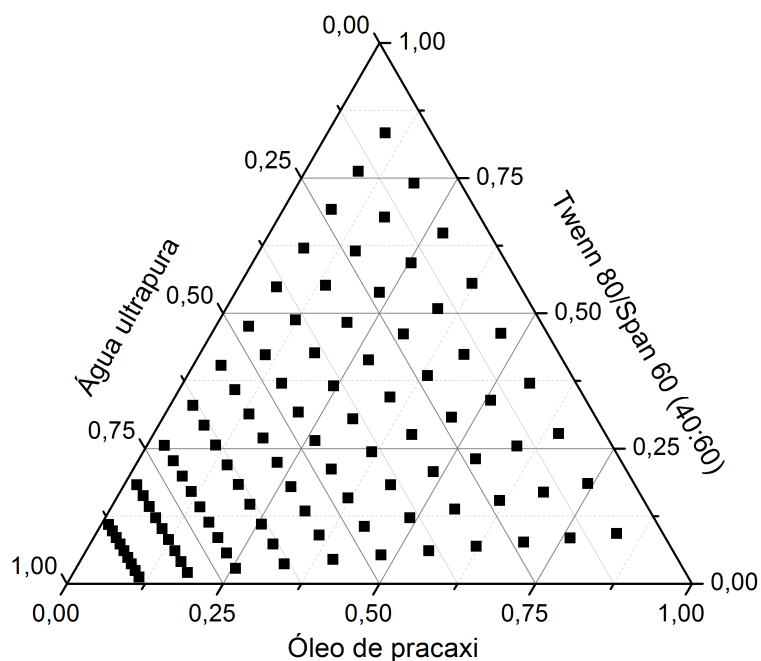
As proporções de óleo de pracaxi, tensoativos e água foram modificadas em cada preparação conforme o incremento de água deionizada adicionada para titulação (11 titulações). A Tabela 8 apresenta a variação ocorrida nas proporções de óleo/tensoativos e água a cada titulação e a Figura 20 apresenta a localização das 99 formulações analisadas no diagrama pseudoternário de fases.

Tabela 8 – Proporções de óleo de pracaxi/tensoativos e água no diagrama de fases pseudoternário.

Mistura de óleo/tensoativos (%) (1:9 a 9:1)	Água deionizada (%)
92,6	7,4
84,7	15,3
76,9	23,1
69,0	31,0
61,0	39,0
52,9	47,1
44,8	55,2
36,6	63,4
28,4	71,6
20,3	79,7
12,2	87,8

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 20 – Diagrama pseudoternário de fases com a localização das 99 formulações analisadas.



Fonte: produzido pelo autor.

4.3.2 Avaliação físico-química de misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi

4.3.2.1 Análise térmica por DSC

A cera de carnaúba pura e as misturas da cera com o óleo de pracaxi, em diferentes proporções, foram submetidas a ensaios de análise térmica. A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada em calorímetro exploratório diferencial Shimadzu modelo DSC-60 Plus (Quioto, Japão), que avaliou a mudança de estado físico e o grau de cristalinidade das amostras, que foram constituídas de cera de carnaúba pura e de misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções (cera:óleo) de 90:10 e 60:40.

As amostras foram preparadas reproduzindo as condições de preparação de CLN. Sendo assim, a cera pura e as misturas em diferentes proporções de cera:óleo foram aquecidas até 100°C e mantidas nesta temperatura durante 1 hora. Em seguida, foram mantidas em temperatura ambiente para resfriar e retornar ao estado sólido (recristalização) (SOUTO; MEHNERT; MÜLLER, 2006). Posteriormente, aproximadamente 2 mg de cada amostra foi adicionada em cadinho de alumínio e fechado. A amostra foi submetida a programação de aquecimento em calorímetro exploratório diferencial Shimadzu modelo DSC-60 Plus (Quioto, Japão) até 100°C, com velocidade de 10°C/min e sob atmosfera inerte de nitrogênio (N₂) com fluxo de 50 mL/min. Os dados obtidos foram tratados no *software* Shimadzu TA-60WS (Quioto, Japão).

4.3.2.2 Difração de raios-X

As amostras de cera de carnaúba pura e mistura de cera:óleo na proporção 60:40 foram avaliadas em difratômetro de raios-X Bruker[®] modelo D8 Advance (Billerica, EUA) com o objetivo de comparar a organização da estrutura cristalina das amostras. A cera pura e a mistura de cera:óleo foram aquecidas em placa aquecedora com agitação magnética até 100°C e mantidas nesta temperatura durante 1 hora. Em seguida, foram resfriadas em temperatura ambiente para retornar ao estado sólido, maceradas, com auxílio de grau e pistilo, e depositadas de forma homogênea em porta-amostras formando uma superfície plana com objetivo de evitar a formação de regiões preferenciais.

As condições de análise foram: ânodo de cobre com tensão de 40 kV, corrente 40 mA, intervalo de medida 10° a 50°, passo de 0,05° e tempo de contagem por passo de 1 segundo.

4.3.3 Seleção da proporção de tensoativos utilizados na formulação de CLN

A proporção de tensoativo hidrofílico (Tween 80) e lipofílico (Span 60) foi definida a partir da determinação do EHL requerido para a mistura, em diferentes proporções, de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.

O EHL requerido (EHL_{req}) para se obter uma pré-emulsão O/A e posterior dispersão de CLN, termodinamicamente estáveis e homogeneamente dispersas, da mistura lipídica (cera/óleo) foi calculado com base no conceito de EHL Zheng et al. (2013),

utilizando a equação Equação 4.3. Onde $\%Lipdio_A$ e $\%Lipdio_B$ correspondem à proporção em (%) de cera de carnaúba e óleo de pracaxi, respectivamente. O valor de EHL_A corresponde ao tensoativo hidrofílico (Tween[®] 80) e o valor de EHL_B ao tensoativo lipofílico (Span[®] 60).

$$EHL_{req} = \frac{(\%Lipdio_A \times EHL_A) + (\%Lipdio_B \times EHL_B)}{100} \quad (4.3)$$

4.3.4 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

As formulações de CLN foram preparadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FarmaTec), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), coordenado pela Profa. Dra. Eliana Martins Lima, através da utilização de planejamentos experimentais fracionado e composto central. A metodologia utilizada para a preparação dos CLN foi de homogeneização a quente sob alta pressão, descrita por (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

A nanodispersão aquosa de CLN foi preparada a quente (90 – 95 °C), em duas etapas. A primeira compreendeu a obtenção de uma pré-emulsão através de dispersão em alto cisalhamento da fase oleosa, constituída de mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi, Span[®] 60 e DXM, na fase aquosa, composta por água e Tween[®] 80, utilizando Ultraturrax IKA[®] modelo T25 (Campinas, Brasil) a 10000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, a pré-emulsão formada na etapa anterior foi submetida a homogeneização à quente (90 – 95 °C) em homogeneizador GEA[®] Niro Soavi modelo Panda 2K NS1001L (Parma, Itália). A dispersão obtida foi transferida para recipientes de vidro e mantida em repouso em temperatura ambiente para a solidificação da matriz lipídica e, conseqüentemente, formação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

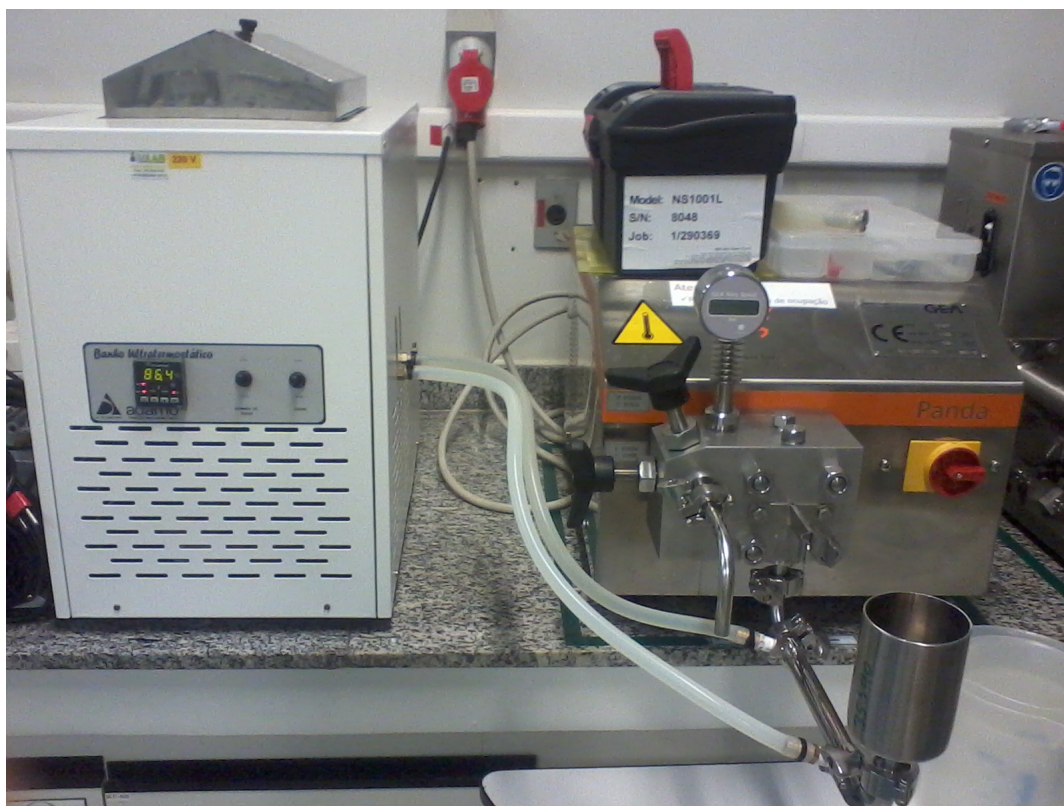
Durante a etapa de homogeneização a alta pressão, o alimentador do homogeneizador foi mantido aquecido a 90 °C com o uso de aparato próprio interligado a um banho-maria ultratermostatizado Adamo modelo LM-80 (São Paulo, Brasil). A Figura 21 demonstra a associação do banho maria ultratermostatizado ao alimentador do homogeneizador de alta pressão.

4.3.4.1 Planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2}

Um planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2} foi realizado, totalizando 19 experimentos com três repetições do ponto central.

Os seis fatores avaliados foram: concentração de DXM na formulação ($\%DXM$), concentração da mistura de tensoativos Tween[®] 80 e Span[®] 60 ($\%TENS$), concentração de mistura lipídica de cera de carnaúba e óleo de pracaxi ($\%LIP$), concentração de óleo utilizada na mistura lipídica ($\%ÓLEO$), quantidade de ciclos de homogeneização à alta pressão ($CICLOS$) e pressão empregada durante a homogeneização ($PRESSÃO$).

Figura 21 – Imagem do banho-maria ultratermostatizado acoplado ao alimentador do homogeneizador a alta pressão.



Fonte: produzido pelo autor.

A Tabela 9 apresenta os fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{6-2} . As respostas avaliadas e os níveis pretendidos estão apresentados na Tabela 10.

A ordem de preparação das formulações foi determinada randomicamente para evitar vieses estatístico nos resultados e as respostas foram obtidas após o término de cada formulação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A matriz dos experimentos realizados no planejamento fatorial 2_{IV}^{6-2} , com as variáveis codificadas e originais para cada nível pode ser observada na Tabela 11. Onde as variáveis codificadas são representadas pelos níveis mínimo (-1), médio (0) e máximo (+1) e as variáveis originais pelas concentrações equivalentes de cada fator.

4.3.4.2 Planejamento composto central

Após os resultados obtidos no fatorial 2_{IV}^{6-2} e conhecendo-se os fatores mais significativos para as respostas requeridas, um planejamento experimental do tipo composto central com dois fatores em cinco níveis ($\alpha = 1,414$) foi realizado, totalizando 11 experimentos com três repetições do ponto central.

As respostas avaliadas e níveis pretendidos seguem o mesmo objetivo do planejamento experimental fracionado, conforme Tabela 10. O modelo polinomial de segunda

Tabela 9 – Fatores e níveis do planejamento experimental fracionado de resolução IV.

Fator	Unidade	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)	
A	%DXM	0,1	0,15	0,2	
B	%TENS	2	3,5	5	
C	%LIP	5	10	15	
D	%ÓLEO	10	25	40	
E	CICLOS	1	3	5	
F	PRESSÃO	bar	300	600	900

Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 10 – Respostas avaliadas e níveis pretendidos para o planejamento experimental.

Resposta	Efeito desejado
Tamanho de partícula (nm)	Minimizar
Índice de polidispersão	Minimizar
Eficiência de incorporação do fármaco (%)	Maximizar

Fonte: Produzido pelo autor.

ordem descrito na equação 4.4 foi utilizado para otimização da formulação.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (4.4)$$

Onde X_i ($i = 1$ ou 2) representa os fatores, β é o coeficiente associado a cada fator, β_i e β_{ii} ($i = 1$ ou 2) são efeitos lineares e quadráticos, respectivamente, e β_0 é o intercepto. O modelo proposto foi avaliado para cada resposta e os dados experimentais analisados estatisticamente pelo teste ANOVA.

Os fatores selecionados a partir do planejamento fatorial 2_{IV}^{6-2} para realizar o planejamento composto central foram %LIP e %TENS. A Tabela 12 apresenta os fatores e os cinco níveis utilizados. Os demais fatores utilizados na preparação dos CLN foram fixados nos seguintes níveis: CICLOS no nível mínimo, %ÓLEO no nível máximo e %DXM e PRESSÃO nos níveis intermediários.

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento composto central com as variáveis originais e codificadas, respectivamente.

4.3.5 Metodologia analítica para quantificação da dexametasona

O desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação da DXM incorporada em CLN e também presente em pele (epiderme e derme) de orelha de porco foi

Tabela 11 – Matriz do planejamento experimental fracionado com as variáveis codificadas e originais.

Formulação	%DXM %(p/p)	%TENS %(p/p)	%LIP %(p/p)	%ÓLEO %(p/p)	CICLOS	PRESSÃO
1	0,10(-1)	5(+1)	5(-1)	40(+1)	5(+1)	300(-1)
3	0,20(+1)	5(+1)	15(+1)	10(-1)	5(+1)	300(-1)
4	0,20(+1)	5(+1)	15(+1)	40(+1)	5(+1)	900(+1)
5	0,10(-1)	2(-1)	5(-1)	40(+1)	1(-1)	900(+1)
6	0,10(-1)	2(-1)	15(+1)	40(+1)	5(+1)	300(-1)
7	0,10(-1)	2(-1)	15(+1)	10(-1)	5(+1)	900(+1)
8	0,10(-1)	2(-1)	5(-1)	10(-1)	1(-1)	300(-1)
9	0,20(+1)	5(+1)	5(-1)	40(+1)	1(1-)	300(-1)
11	0,20(+1)	2(-1)	15(+1)	10(-1)	1(-1)	900(+1)
12	0,20(+1)	2(-1)	5(-1)	10(-1)	5(+1)	300(-1)
13	0,20(+1)	2(-1)	5(-1)	40(+1)	5(+1)	900(+1)
14	0,10(-1)	5(+1)	5(-1)	10(-1)	5(+1)	900(+1)
15	0,20(+1)	5(+1)	5(-1)	10(-1)	1(-1)	900(+1)
17	0,10(-1)	5(+1)	15(+1)	10(-1)	1(-1)	300(-1)
18	0,20(+1)	2(-1)	15(+1)	40(+1)	1(-1)	300(-1)
19	0,10(+1)	5(+1)	15(+1)	40(+1)	1(-1)	900(+1)
Pontos centrais						
2	0,15(0)	3,50(0)	10(0)	25(0)	3(0)	600(0)
10	0,15(0)	3,50(0)	10(0)	25(0)	3(0)	600(0)
16	0,15(0)	3,50(0)	10(0)	25(0)	3(0)	600(0)

Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 12 – Fatores e níveis do planejamento composto central.

Fator	Unidade	Nível (-1,41)	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)	Nível (+1,41)
A	%LIP %(p/p)	8,96	10	12,5	15	16,04
B	%TENS %(p/p)	1,38	2	3,5	5	5,62

Fonte: Produzido pelo autor.

baseada em metodologias propostas por Beck (2001), Beber et al. (2016) e Friedrich, Fontana e Beck (2008).

O método de separação e quantificação da DXM foi desenvolvido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um sistema cromatográfico composto por um módulo separador Waters[®] (Miliford, EUA) modelo Alliance e2625 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters[®] modelo 2998 (Miliford,

Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental de composição central com as variáveis codificadas e originais.

Formulação	%LIP %(p/p)	%TENS %(p/p)
1	12,5(0)	5,62(+1,41)
3	15(1)	5(1)
4	10(-1)	2(-1)
5	8,96(-1,41)	3,5(0)
7	16,04(+1,41)	3,5(0)
8	15(1)	2(-1)
9	10(-1)	5(1)
10	12,5(0)	1,38(-1,41)
Pontos centrais		
2	12,5(0)	3,5(0)
6	12,5(0)	3,5(0)
11	12,5(0)	3,5(0)

Fonte: Produzido pelo autor.

EUA). O tratamento dos dados obtidos foi realizado no *software* Waters[®] Empower[™] versão 2.0 (Milford, EUA).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma C-18, de fase reversa, Waters[®] (Miliford, EUA) modelo *XBridge*[™] com dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130 Å, tamanho de partícula de 3,5 µm e área de superfície de 185 m²/g. Precedida por uma pré-coluna Waters[®] (Miliford, EUA), de 20 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com as mesmas especificações da coluna. A coluna foi equilibrada com a eluição de fase móvel por um tempo correspondente a 10 vezes o seu volume anteriormente à cada sequência de injeções de amostras.

O comprimento de onda de absorção máxima da DXM foi determinado por meio de uma varredura no espectro eletromagnético, na região que compreende a radiação UV-visível, no intervalo de comprimento de onda de 200 nm a 400 nm de uma amostra de solução de DXM 1,4 µg/mL diluída em fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila (C₂H₃N) grau CLAE LiChrosolv[®] (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemanha) e ácido trifluoroacético (C₂HF₃O₂) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) 0,05 % (v/v) em água ultrapura obtida em sistema de purificação de água Merck-Millipore[®] modelo Milli-Q[®] (Darmstadt, Alemanha), com resistividade elétrica de 12,2 MΩ/cm e teor de carbono orgânico total de 2 ppb a 25 °C, na proporção (45:55).

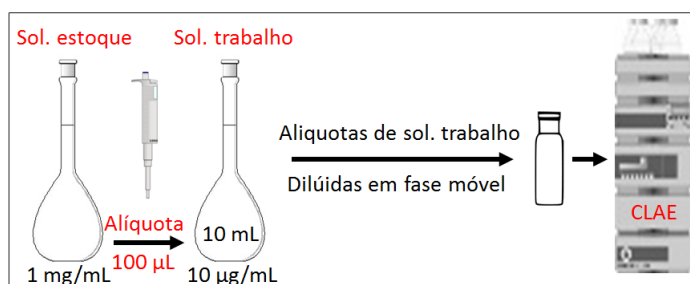
A curva analítica, compreendida no intervalo de concentração de DXM entre 0,1 µg/mL e 2,6 µg/mL, foi obtida com as condições cromatográficas a seguir: fase móvel

eluída em modo isocrático com fluxo de 0,8 mL/min e sob temperatura de 25 °C. O volume de injeção de amostra foi de 100 µL e o detector PDA foi configurado para efetuar leitura no comprimento de onda de 240 nm.

Os pontos da curva analítica (0,1 µg/mL - 2,6 µg/mL) foram preparados a partir de uma solução de trabalho, com DXM na concentração de 10 µg/mL, obtida por meio da diluição de 100 µL de uma solução estoque de DXM a 1 mg/mL com metanol (CH₃OH) em balão volumétrico de 10 mL e posterior obtenção dos pontos da curva analítica de acordo com o diagrama representado na Figura 22 (RIBANI et al., 2004).

A solução estoque foi preparada a partir da dissolução da massa de 10 mg de DXM, pesada em balança analítica Shimadzu[®] modelo AY 220 (Kyoto, Japão), com metanol em balão volumétrico de 10 mL.

Figura 22 – Diagrama da preparação da solução de trabalho de DXM (10 µg/mL) e dos pontos da curva analítica.



Fonte: produzido pelo autor.

As alíquotas da solução de trabalho foram retiradas e diluídas em quantidade suficiente de fase móvel para se obter as concentrações de 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1,4 µg/mL, 2,0 µg/mL e 2,6 µg/mL, totalizando 7 pontos. Os primeiros três pontos da curva apresentaram incrementos de 0,3 µg/mL e os demais pontos incrementos de 0,6 µg/mL. As alíquotas de solução de trabalho e os volumes correspondentes de fase móvel utilizados para se obter as diluições referentes a cada ponto da curva analítica estão representados na Tabela 14.

O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado através da análise dos cromatogramas obtidos de acordo com os seguintes parâmetros: fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de cauda.

4.3.5.1 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada por meio das figuras de mérito a seguir: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009; RIBEIRO et al., 2008; RIBANI et al., 2004). Os parâmetros analíticos destas etapas da validação foram realizadas de acordo

Tabela 14 – Pontos da curva analítica de DXM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e respectivas alíquotas de solução de trabalho e fase móvel.

Ponto da curva analítica	Solução de trabalho ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)	Fase móvel
P1 - $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$	$10 \mu\text{L}$	$990 \mu\text{L}$
P2 - $0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$	$20 \mu\text{L}$	$980 \mu\text{L}$
P3 - $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$	$50 \mu\text{L}$	$950 \mu\text{L}$
P4 - $0,8 \mu\text{g}/\text{mL}$	$80 \mu\text{L}$	$920 \mu\text{L}$
P5 - $1,4 \mu\text{g}/\text{mL}$	$140 \mu\text{L}$	$860 \mu\text{L}$
P6 - $2,0 \mu\text{g}/\text{mL}$	$200 \mu\text{L}$	$800 \mu\text{L}$
P7 - $2,6 \mu\text{g}/\text{mL}$	$260 \mu\text{L}$	$740 \mu\text{L}$

Fonte: Produzido pelo autor.

com o guia *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, publicado pela *International Conference on Harmonization (ICH)* e a Resolução nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que abordam a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BASHAW et al., 2014; BRASIL, 2003). Todas as etapas foram realizadas no mínimo em triplicata.

4.3.5.1.1 Seletividade

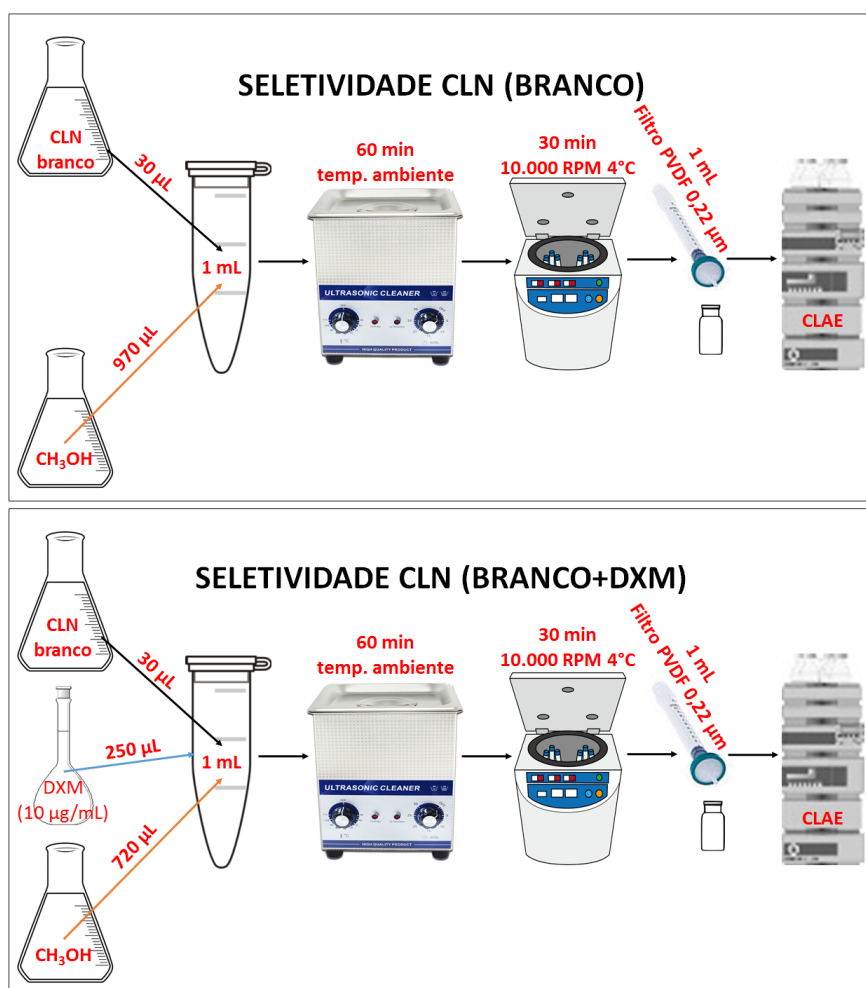
A seletividade foi avaliada por meio da comparação de cromatogramas de uma amostra (BRANCO) isenta da substância de interesse (DXM) e de amostra adicionada desta substância (BRANCO+DXM). Foi verificado a ocorrência de interferentes presentes nas amostras que possam ter eluído no mesmo tempo de retenção da DXM, garantindo assim, que o pico obtido, relativo à DXM, é exclusivo da mesma. A seletividade foi avaliada individualmente para interferentes oriundos de componentes da formulação de CLN e da matriz biológica (pele de orelha de porco).

A avaliação da seletividade para interferentes oriundos de componentes da formulação de CLN foi realizada de acordo com a metodologia descrita a seguir: uma alíquota de $30 \mu\text{L}$ de CLN branco foi adicionada em tubo cônico de $1,5 \text{ mL}$ e diluída com $970 \mu\text{L}$ de metanol CH_3OH , totalizando 1 mL de amostra. Em seguida, foi submetida a banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil) por 60 minutos em temperatura ambiente seguida por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos à temperatura de 4°C em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão). Uma alíquota de 1 mL foi retirada do sobrenadante, filtrada em filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Millex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de $0,22 \mu\text{m}$, e analisada por CLAE, de acordo com metodologia apresenta na subseção 4.3.5.

Uma segunda amostra, denominada CLN (BRANCO+DXM), composta por ($30 \mu\text{L}$) de CLN, $250 \mu\text{L}$ de solução de trabalho de DXM ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) e $720 \mu\text{L}$ de fase móvel foi

preparada. Esta amostra foi submetida ao mesmo processo de extração descrito para a amostra CLN (BRANCO). A Figura 23 apresenta um diagrama com a metodologia de preparação das amostras CLN (BRANCO) e CLN (BRANCO+DXM) para avaliação da seletividade do método analítico.

Figura 23 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras para avaliação da seletividade do método analítico.



Fonte: produzido pelo autor.

A avaliação da seletividade para interferentes oriundos da matriz biológica (pele de orelha de porco) foi realizada em duas etapas: a primeira verificou interferentes oriundos do estrato córneo da orelha de porco e a segunda interferentes oriundos da pele (epiderme e derme) de amostras de orelha de porco submetidas previamente ao processo de remoção do estrato córneo por meio da técnica de *tape stripping*.

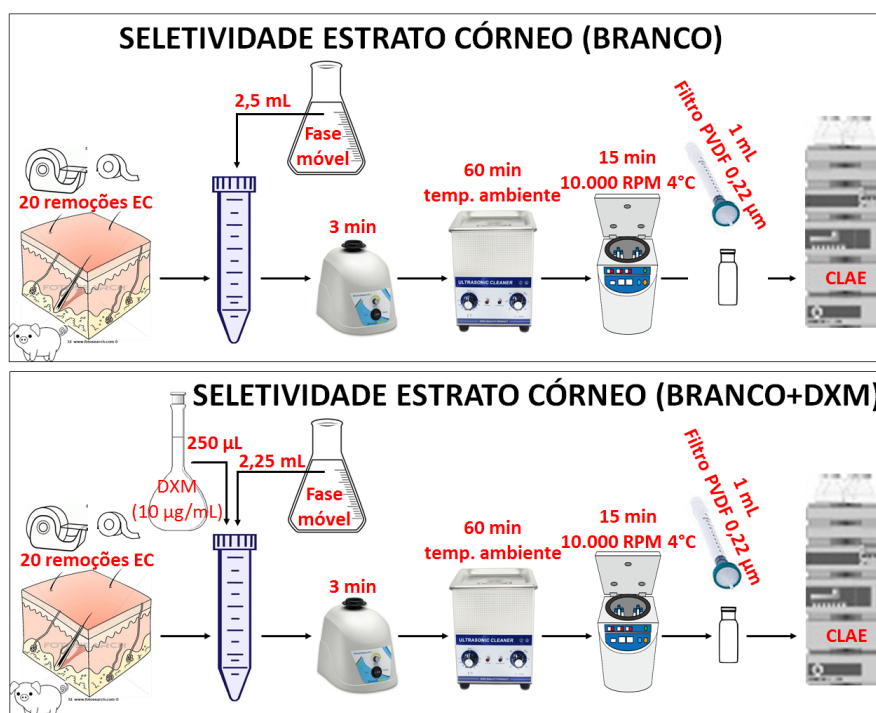
As amostras de estrato córneo submetidas a avaliação da seletividade do método analítico foram preparadas a partir de 20 remoções de estrato córneo da pele de orelha de porco com fitas adesivas 3M[®] (Sumaré, Brasil), modelo Durex[®] Transparente, que foram posteriormente adicionadas em tubos cônicos de 15 mL. Em seguida, as amostras de estrato

córneo (BRANCO) aderidas às fitas foram submetidas ao processo de extração iniciado pela adição de 2,5 mL de fase móvel, homogeneização em agitador para tubos do tipo vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil) por 3 minutos, seguido por banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após ultrassom, as amostras foram submetidas a centrifugação em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão) a 10.000 rpm durante 15 minutos e à temperatura de 4°C. Finalmente, as amostras foram filtradas em filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 µm, acondicionadas em *vials* e analisadas por CLAE, de acordo com metodologia apresenta na subseção 4.3.5.

Outra amostra de extrato córneo (BRANCO+DXM) foi preparada de acordo com o mesmo método de remoção adotado na amostra anterior, seguido da adição de 250 µL de solução de trabalho de DXM (10 µg/mL), (2,25 mL) de fase móvel e submetida a processo de extração idêntico a da amostra extrato córneo (BRANCO).

Os cromatogramas das duas amostras, extrato córneo (BRANCO) e extrato córneo (BRANCO+DXM), foram avaliados. A Figura 24 apresenta um diagrama com a metodologia de preparação das amostras de extrato córneo (BRANCO) e extrato córneo (BRANCO+DXM) para avaliação da seletividade do método analítico.

Figura 24 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras de extrato córneo para avaliação da seletividade do método analítico.



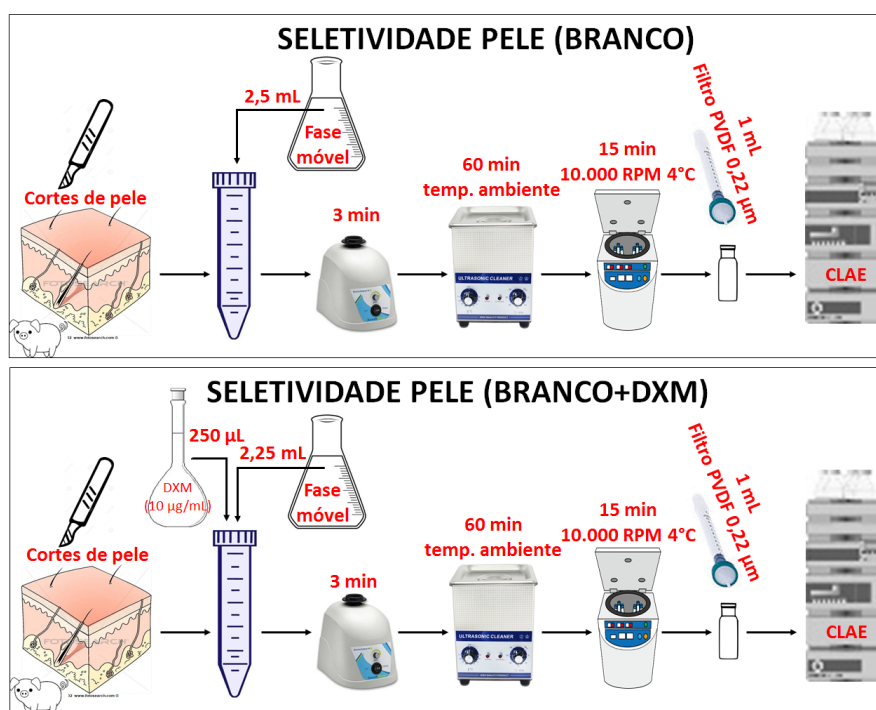
Fonte: produzido pelo autor.

As amostras de pele (BRANCO), submetidas previamente ao processo de remoção

do estrato córneo por meio da técnica de *tape stripping*, foram fragmentadas em pequenos pedaços com auxílio de bisturi e posteriormente foi realizado processo de extração idêntico ao executado para as amostras de estrato córneo.

As amostras de pele (BRANCO+DXM) foram preparadas de forma semelhante, no entanto, com a adição de 250 μL de solução de trabalho de DXM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e (2,25 mL) de fase móvel. A Figura 25 apresenta um diagrama com a metodologia de preparação utilizada para as amostras de pele sem a presença de estrato córneo (BRANCO) e (BRANCO+DXM) para avaliação da seletividade do método analítico.

Figura 25 – Diagrama com a metodologia de preparação das amostras de pele, sem a presença de estrato córneo, para avaliação da seletividade do método analítico.



Fonte: produzido pelo autor.

4.3.5.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas obtidas a partir da regressão linear simples, pelo método dos mínimos quadrados, do gráfico de dispersão das concentrações referentes a cada ponto da curva (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tabela 14) e suas respectivas áreas do pico correspondente.

O método dos mínimos quadrados e a equação obtida da regressão linear correspondente à curva analítica forneceu os coeficientes de regressão a (linear - intercepto no eixo y) e b (angular). Também foi obtido, a partir da dispersão de cada ponto da curva, a adequação do ajuste da curva e o nível de correlação entre a concentração do analito

(DXM) e área do pico correspondente, através dos coeficientes de correlação de Pearson (r) e de determinação (r^2).

4.3.5.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da Equação 4.5 e Equação 4.6, respectivamente. Onde s é o desvio padrão do coeficiente linear (a) e S corresponde à inclinação da curva analítica (coeficiente angular b) (BASHAW et al., 2014).

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{s}{S}\right) \quad (4.5)$$

$$LQ = 10 \times \left(\frac{s}{S}\right) \quad (4.6)$$

4.3.5.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A repetibilidade foi verificada com 3 repetições de uma concentração baixa (0,1 µg/mL), média (1,4 µg/mL) e alta (2,6 µg/mL), totalizando 9 determinações dentro do intervalo do método analítico. A repetibilidade em matrizes biológicas (estrato córneo e pele remanescente) foi verificada com 5 repetições de uma concentração baixa (0,1 µg/mL), média (1,4 µg/mL) e alta (2,6 µg/mL), totalizando 15 determinações dentro do intervalo do método bioanalítico.

A precisão intermediária foi verificada com os mesmos critérios da repetibilidade, no entanto, em dois dias diferentes com intervalos de três dias entre os mesmos.

4.3.5.1.5 Exatidão

A exatidão do método foi verificada por meio da determinação da concentração de três pontos da curva analítica em triplicata, totalizando 9 determinações. Foram selecionados um ponto baixo (0,1 µg/mL), médio (1,4 µg/mL) e alto (2,6 µg/mL).

Foi utilizado o processo de recuperação de DXM para se avaliar a exatidão do método analítico em formulação de CLN e em matriz biológica (pele de orelha de porco). Para isso, foram realizadas contaminações (*spiking*) em três concentrações diferentes (0,1 µg/mL, 1,4 µg/mL e 2,6 µg/mL) com quantidades conhecidas de DXM.

A recuperação de DXM em formulação de CLN ocorreu da seguinte forma: quantidade suficiente de solução de trabalho de DXM (concentração de 10 µg/mL) para se obter as três concentrações de DXM avaliadas (0,1 µg/mL, 1,4 µg/mL e 2,6 µg/mL) foram adicionadas em tubos cônicos de 1,5 mL e, em seguida, foi adicionado 30 µL de CLN branco e diluído com 970 µL de metanol, totalizando 1 mL de amostra. Em seguida, as

amostras foram submetidas ao processo de extração idêntico ao executado na avaliação da seletividade (subseção 4.3.5.1.1, Figura 23).

A recuperação de DXM das amostras de estrato córneo (20 remoções de estrato córneo da pele de orelha de porco com fitas adesivas) e pequenos pedaços de pele (epiderme+derme) submetida previamente à remoção de estrato córneo através da técnica de *tape stripping* ocorreu pela adição das mesmas, separadamente, em tubo cônico de 15 mL seguida pela adição de quantidade suficiente de solução de trabalho de DXM (concentração de 0,1 µg/mL) para se obter as três concentrações de DXM avaliadas (0,1 µg/mL, 1,4 µg/mL e 2,6 µg/mL). Em seguida foi adicionado quantidade suficiente de fase móvel para se obter o volume final de 2,5 mL e submetidas ao mesmo processo de extração executado na avaliação da seletividade para amostras de matriz biológica (subseção 4.3.5.1.1, Figura 24 e Figura 25, respectivamente).

As concentrações de DXM de cada amostra foram obtidas por meio da utilização da equação da regressão linear correspondente à curva analítica. As concentrações obtidas através da curva analítica foram utilizadas para o cálculo do desvio padrão relativo em relação aos valores teóricos e a Equação 4.7 foi utilizada para determinar a proximidade dos pontos obtidos experimentalmente e os valores teóricos.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (4.7)$$

4.3.5.1.6 Robustez

A robustez foi realizada por meio de alterações deliberadas nos parâmetros cromatográficos estabelecidos na metodologia analítica (subseção 4.3.5). Os parâmetros modificados foram: fluxo de fase móvel, temperatura da coluna e composição da fase móvel. A variação foi de $\pm 5\%$ em cada parâmetro. Os parâmetros e as condições utilizadas estão descritos na Tabela 15.

A avaliação da robustez foi realizada por meio da injeção de amostras de DXM na concentração de 1,4 µg/mL e posterior determinação da concentração de DXM por meio da área do sinal analítico obtido e a utilização equação da curva analítica. O desvio padrão e desvio padrão relativo também foram calculados. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.6 Solubilidade da DXM em óleo de pracaxi

A solubilidade da DXM em óleo de pracaxi foi determinada através da adição de 5 mL de óleo de pracaxi, separadamente, em 3 tubos criogênicos de 5 mL e, em seguida, quantidade de DXM suficiente para ocorrer saturação no óleo de pracaxi foi adicionada a estes tubos. As amostras foram mantidas em agitação com barra magnética por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, alíquotas de 1 mL, aproximadamente,

Tabela 15 – Condições cromatográficas utilizadas para avaliação da robustez do método analítico.

Parâmetro cromatográfico	Alterações avaliadas	
Fluxo de fase móvel	0,76 mL/min	0,84 mL/min
Temperatura da coluna	23,75 °C	26,25 °C
Proporção de fase móvel (ACN:H ₂ O)	(47,75:52,25)	(42,75:57,25)

Fonte: Produzido pelo autor.

foram filtradas com filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 µm. Uma alíquota de 500 µL do óleo de pracaxi foi filtrada e transferida para tubo cônico de 15 mL. Em seguida, a amostra foi diluída com acetonitrila para o volume de 5 mL e submetida a banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos em temperatura ambiente.

Após dispersão em ultrassom, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão) e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi transferida para tubo cônico de 2 mL e diluída com fase móvel para o volume de 1,5 mL. Por último, a amostra foi homogeneizada em agitador para tubos do tipo vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil) por 30 segundos, acondicionada em *vial* e a DXM quantificada em CLAE de acordo com a metodologia descrita na subseção 4.3.5. A determinação da solubilidade da DXM em óleo de pracaxi foi realizada em sextuplicata.

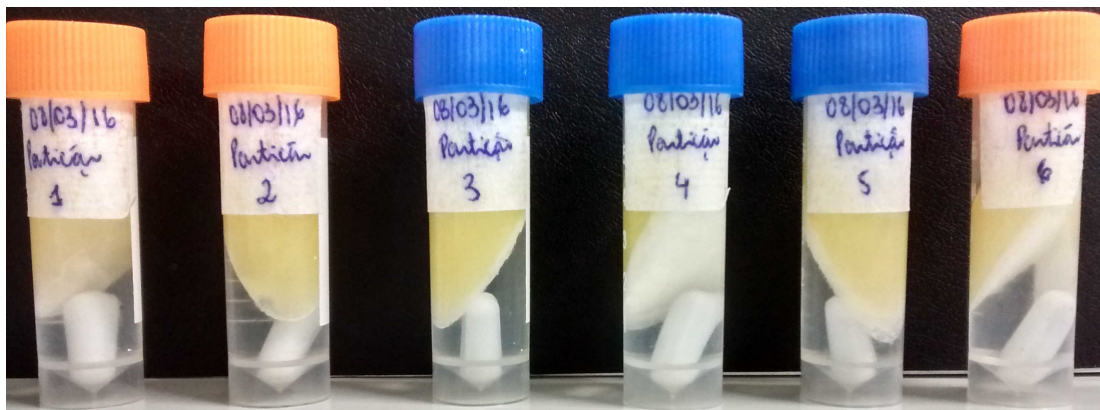
4.3.7 Coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi e água

O coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi e água foi determinado através da dissolução de 100 µg de DXM em 2,5 mL de óleo de pracaxi (fase oleosa) em tubos criogênicos de 5 mL com tampa rosqueada. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de água ultrapura (fase aquosa) e as duas fases foram submetidas à agitação com barra magnética por um período de 24 horas à temperatura ambiente (25 °C).

Após o período de agitação, as fases foram separadas por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão). Em seguida, as fases (aquosa e oleosa) foram coletadas separadamente e filtradas em filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 µm. A Figura 26 apresenta os tubos criogênicos após a centrifugação e a separação das fases oleosa (óleo de pracaxi) e aquosa (água ultrapura).

Uma alíquota de 20 µL de fase aquosa foi diluída em fase móvel para o volume final de 1 mL em tubo cônico de 1,5 mL e homogeneizada em agitador para tubos do tipo

Figura 26 – Imagem obtida no ensaio de determinação do coeficiente de partição da DXM em óleo de pracaxi apresentando a separação das fases aquosa e oleosa após centrifugação.



Fonte: produzido pelo autor.

vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil) por 30 segundos. A amostra de fase oleosa foi preparada da seguinte forma: uma alíquota de 20 μL foi adicionada em tubo cônico de 1,5 mL e diluída com acetonitrila para o volume final de 1 mL.

Em seguida, a mistura foi dispersa em agitador para tubos do tipo vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil) por 30 segundos e submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão) para separação das fases (óleo e acetonitrila). Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi colocada em um novo tubo cônico de 1,5 mL e diluída com fase móvel para o volume final de 1 mL.

As amostras foram acondicionadas em *vials* e a DXM presente em ambas as fases foi quantificada em CLAE através da metodologia descrita na subseção 4.3.5. O ensaio foi realizado em sextuplicata. O coeficiente de partição ($\log P$) foi obtido pelo \log da razão (P) entre a solubilidade da DXM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no óleo de pracaxi e na água.

4.3.8 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

4.3.8.1 Determinação de tamanho médio e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho médio do CLN foi determinado utilizando-se a técnica de detecção da intensidade de espalhamento de luz em ângulo de 90° em um equipamento Malvern[®] modelo Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra).

Uma alíquota de 10 μL de dispersão aquosa de CLN foi diluída 100 vezes utilizando 990 μL de água ultra pura Millipore[®] Mili-Q (Darmstadt, Alemanha) para garantir que a intensidade de luz retroespalhada se encontrasse dentro dos parâmetros de sensibilidade do equipamento, e em seguida analisada à temperatura de 25 °C.

Em cada leitura foi obtido o diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI). Os

resultados obtidos correspondem a leituras em triplicata de diferentes amostras da mesma formulação.

4.3.8.2 Eficiência de incorporação de fármaco

A eficiência de incorporação de DXM pelo CLN foi obtida por meio da razão entre a quantidade de DXM não incorporada no CLN (fármaco livre) e a quantidade de DXM presente na formulação (fármaco total). O resultado da razão foi multiplicado por 100 para se obter a porcentagem de fármaco incorporado no CLN (eficiência de incorporação), conforme a equação Equação 4.8 (TAMJIDI et al., 2013; DAS; NG; TAN, 2012; LIU; WU, 2010).

Para se conhecer a concentração de DXM na formulação (fármaco total), uma alíquota de 300 μL da dispersão de CLN foi retirada, previamente agitada em vórtex por 1 minuto, e diluída para 10 mL com metanol. Posteriormente, foi submetida a banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil) por 60 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos em centrífuga Kubota[®] modelo KR-20000T (Tokyo, Japão). Em seguida, uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi diluída em 950 μL de fase móvel. A amostra diluída foi filtrada em filtros Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 μm e acondicionada em *vial* para posterior quantificação da DXM por CLAE de acordo com a metodologia descrita na subseção 4.3.5.

$$\%EE = \left(\frac{DXM_{\text{total}} - DXM_{\text{livre}}}{DXM_{\text{total}}} \right) \times 100 \quad (4.8)$$

A DMX não incorporada no CLN (fármaco livre), presente na fase aquosa, foi separada da incorporada ao CLN através de processo de ultrafiltração utilizando dispositivos Sartorius Vivaspin[®] 2 (Goettingen, Alemanha) com membrana de polietersulfona (PES) e *cut-off* de 10 Kda. Uma alíquota de 100 μL de dispersão de CLN foi transferida para o dispositivo de ultrafiltração e diluída na proporção 1:20 com 1900 μL de água ultrapura. A diluição nesta proporção teve o objetivo de solubilizar possíveis cristais de dexametasona presentes na fase externa da dispersão de CLN, evitando subestimar o resultado de eficiência de incorporação (MENDES et al., 2013; ARAÚJO et al., 2010; ABREGO et al., 2016).

Após a diluição da amostra de CLN, a mesma foi centrifugada a 4000 rpm durante 30 minutos. O filtrado obtido foi coletado, e a DXM livre quantificada por CLAE de acordo com a metodologia descrita na subseção 4.3.5.

4.3.8.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A visualização dos CLN foi realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As nanopartículas foram diluídas na proporção 1:20 e 10 μL adicionados

cuidadosamente sobre grade de cobre revestida com filme de Formvar[®]. A dispersão de CLN foi mantida sobre a grade durante 30 segundos e, em seguida, o excesso foi removido com auxílio de papel filtro. Após a retirada de excesso de CLN sobre as grades, os CLN receberam contraste negativo com a adição de 10 µL de solução de ácido fosfotúngstico (PTA) a 1 % sobre a grade. O PTA foi mantido em contato por 30 segundos e, posteriormente, removido com auxílio de papel filtro.

As grades foram armazenadas em embalagens plásticas protegidas, secas à temperatura ambiente e posteriormente visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai[®] modelo G2 Spirit Biotwin (Hillsboro, EUA), operado a 80 kV.

4.3.9 Secagem dos CLN por liofilização

As amostras de CLN selecionadas no planejamento experimental foram secas por liofilização no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FarmaTec), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), coordenado pela Profa. Dra. Eliana Martins Lima. O processo se deu através do congelamento da amostra de CLN, em recipiente de vidro âmbar, em temperatura de -20 °C durante 12 horas seguido por liofilização em liofilizador ThermoFisher Scientific modelo Micromodulyo-115 (Waltham, USA) sob pressão de 2,0 Pa, temperatura de -40 °C e por um período de 24 horas.

A trealose (C₁₂H₂₂O₁₁) foi utilizada como agente crioprotetor das dispersões de CLN na concentração de 15 % em relação a massa de lipídio na formulação.

4.3.9.1 Preparação das formulações utilizadas nos ensaios *in vitro*

As formulações avaliadas nos ensaios de liberação *in vitro* da DXM foram: gel de DXM livre (Gel DXM), gel de DXM incorporada em CLN (Gel CLN-DXM) e dispersão aquosa de CLN contendo DXM incorporada (CLN-DXM).

O gel de Carbopol[®] utilizado como excipiente para a DXM e para a DXM contida em CLN foi gentilmente cedido pela Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade (FECDA) da UFPE, sob supervisão técnica da Profa. Dra. Leila Bastos Leal. A formulação do gel pode ser visualizada na Tabela 16.

A dispersão aquosa de CLN contendo DXM (CLN-DXM) foi reconstituída por meio da adição de água ultrapura, de forma gradual, na formulação 9 liofilizada. Adicionou-se 1 mL de água ultrapura no líofilo seguido de homogeneização em agitador para tubos do tipo vórtex Biomixer[®] modelo Multi-mixer (São Carlos, Brasil) por 1 minuto, repetindo o procedimento até se alcançar a adição do volume de 5 mL de água. O objetivo da reconstituição gradativa foi de evitar a ruptura da estrutura porosa do líofilo, desestabilização do sistema, e conseqüentemente, comprometer a qualidade da dispersão (MORAIS et al., 2016).

O gel de DXM livre (Gel DXM) foi obtido por meio da incorporação de DXM (10 mg), previamente dispersa em propilenoglicol (78 mg), em gel de Carbopol[®] na concentração

Tabela 16 – Formulação de gel de Carbopol[®] utilizado como excipiente para as formulações.

Componente	Quantidade	Função
Carbopol [®]	1%	Espessante
Nipagin [®]	0,1%	conservante
Nipazol [®]	0,05%	convervante
EDTA	0,1%	Quelante
Propilenoglicol	3%	Umectante
Trietanolamina	q.s	alcalinizante
Água deionizada	q.s.p	Veículo

Fonte: Produzido pelo autor.

de 0,01 % (m/m) de DXM. A composição da formulação Gel DXM foi: DXM 0,1 %, propilenoglicol 0,78 % e gel de Carbopol[®] q.s.p 100 %.

O gel de CLN contendo DXM incorporada (Gel CLN-DXM) foi obtido por meio da adição da dispersão aquosa de CLN (formulação 9) em gel de Carbopol[®] na proporção 8:2. A concentração de DXM na formulação Gel CLN-DXM foi de 0,057 % (m/m).

4.3.10 Liberação *in vitro* da DXM

A cinética de liberação *in vitro* da DXM foi realizada em células de difusão vertical do tipo Franz acopladas ao sistema automatizado Hanson Vision[®] MICROETTE[™] Plus (Chatsworth, EUA). Foram utilizadas membranas de acetato de celulose com *molecular weight cut-off* (MWCO) de 10000 Da Fisher Scientific[®] (Pittsburgh, EUA). Previamente ao uso, as membranas foram imersas em água ultrapura e, em seguida, recortadas em formato circular com tamanho suficiente (cerca de 3 cm²) para cobrir a parte superior da célula de difusão. A remoção de vestígios de glicerol contido nas membranas foi realizada por meio da imersão das mesmas em béquer contendo água ultrapura fervente e mantidas por 20 minutos, repetindo-se o processo três vezes. Após a remoção de vestígios de glicerol, as membranas foram mantidas submersas em água ultrapura e armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso.

O meio receptor utilizado foi preparado a partir da dissolução de 0,02 % (m/v) de Tween[®] 80 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.

As células de difusão foram preenchidas com meio receptor (aproximadamente 7 mL) e as membranas de acetato de celulose, previamente tratadas, foram dispostas sobre as mesmas cobrindo uma área útil para ocorrência de passagem de soluto de 1,86 cm². O sistema foi mantido sob agitação a 350 rpm e temperatura de 37 ± 0,5 °C. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

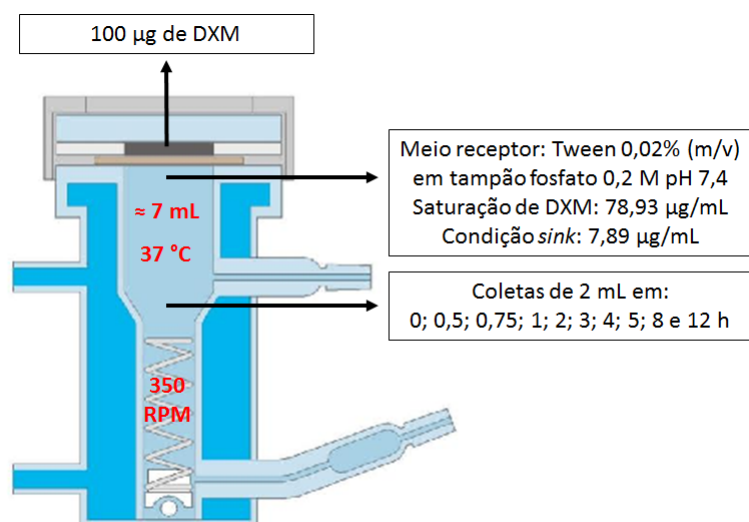
Quantidades suficientes de gel de DXM 0,1 % (m/m), gel de CLN contendo DXM e

dispersão aquosa de CLN contendo DXM para se obter a massa de 100 μg de DXM foram adicionadas no compartimento doador das células de difusão e espalhadas uniformemente sobre as membranas de acetato de celulose, compreendendo uma área de 1,86 cm^2 .

Alíquotas de 1 mL do compartimento receptor foram coletadas em intervalos de tempo predeterminados: 0, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 12 horas. O mesmo volume coletado foi restituído imediatamente para a manutenção de volume constante nas células de difusão. As condições *sink* foram mantidas durante todo o experimento.

A Figura 27 contém uma representação gráfica da célula de Franz e as condições em que foram executados os ensaios de liberação *in vitro* da DXM.

Figura 27 – Representação gráfica da célula de Franz e as condições utilizadas na execução da liberação *in vitro* da DXM.



Fonte: adaptado de <https://hansonresearch.com/diffusion-testing/vision-microette/>.

Para obtenção da concentração de fármaco liberada no compartimento receptor, as alíquotas coletadas foram filtradas em filtros de PVDF Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV com poro de 0,22 μm e quantificadas por CLAE nas condições descritas na subseção 4.3.5.

Devido à retirada de alíquotas do meio receptor nos tempos predeterminados, para determinação da concentração de DXM, e a posterior diluição do meio provocada pela reposição do mesmo volume com meio receptor fresco, fez-se necessário corrigir a quantidade acumulada de DXM liberada ao longo do tempo. Esta correção foi realizada com o auxílio da Equação 4.9.

$$Q_{real} = C_{mensurada,t} \times Vr + Va \times \sum_{n=1}^{n-1} \times Ca \quad (4.9)$$

Onde Q_{real} é a quantidade acumulada no tempo t , $C_{mensurada}$ é a concentração da amostra ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no tempo t , Vr é o volume ocupado pelo meio receptor corresponde à

cada célula (entre 6,45 mL e 6,86 mL), Va é o volume de amostra retirado a cada coleta (1 mL de *rinse* e 1 mL de coleta) e Ca é a concentração de amostra removida nos tempos anteriores.

Dessa forma, a quantidade acumulada de fármaco liberada no tempo t é igual à quantidade mensurada no tempo t acrescida do somatório das quantidades retiradas do compartimento receptor nos tempos de coleta anteriores.

O perfil de liberação da DXM foi determinado graficamente através da relação entre a quantidade liberada acumulada de DXM por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelo tempo (horas) da região onde a liberação estava em estado de equilíbrio *steady-state* do experimento. Os dados obtidos foram utilizados para a determinação do modelo de liberação mais adequado através do delineamento de modelos de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi.

O modelo de liberação de ordem zero está representado pela Equação 4.10. Onde Qt é a quantidade de DXM liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de DXM no meio receptor (zero) e k é a constante de liberação. O gráfico que representa a Equação 4.10 produzirá uma linha reta, com inclinação igual a k e liberação independente da concentração.

$$Qt = Q_0 + k \times t \quad (4.10)$$

O modelo de cinética de primeira ordem está representado pela Equação 4.11. Onde $\text{Log } C$ é o log da quantidade de DXM liberada no tempo t , $\text{log } C_o$ é o log da quantidade inicial de DMX no meio receptor (zero) e k é a constante de liberação.

$$\text{Log } C = \text{log } C_o - \frac{k \times t}{2.303} \quad (4.11)$$

O modelo de Higuchi está representado pela Equação 4.12. Onde Qt é a quantidade de DXM liberada no tempo t e k é a constante de liberação.

$$Q_t = k \times \sqrt{t} \quad (4.12)$$

A forma de elaboração da representação gráfica dos modelos apresentados, de acordo com a equação correspondente, estão exibidas na Tabela 17.

Tabela 17 – Equações e instruções para elaboração das representações gráficas dos modelos de liberação avaliados.

Modelo	Equação	Representação gráfica
Ordem zero	$Qt = Q_0 + k_0 \times t$	Concentração de DXM liberada \times tempo
Primeira ordem	$\text{Log } C = \text{log } C_o - \frac{k \times t}{2.303}$	Log da concentração de DXM liberada \times tempo
Higuchi	$Q_t = k \times \sqrt{t}$	Concentração de DXM liberada $\times \sqrt{\text{tempo}}$

Fonte: Produzido pelo autor.

O modelo que apresentou correlação linear, avaliada através do coeficiente de determinação (r^2), mais próxima de 1 foi determinado como o mais adequado para interpretar a liberação da DXM *in vitro*.

A análise estatística da diferença, referente à concentração acumulada de DXM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em cada tempo de coleta, entre os grupos avaliados foi realizada através de ANOVA seguida pela avaliação das diferenças entre as medias pelo teste *t*. Diferenças entre as médias com valor de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4.3.11 Penetração e/ou permeação cutânea *in vitro*

As peles foram obtidas de orelhas de porco recém abatido e imediatamente submetidas à metodologia de preparo e armazenamento. O preparo das pele se deu inicialmente pela lavagem das orelhas em água corrente, sem utilização de detergentes, para remoção de resíduos. Em seguida, o tecido cutâneo da parte posterior da orelha foi retirado com auxílio de bisturi, tesoura e pinça e, em seguida, o tecido adiposo subcutâneo remanescente e os pelos encontrados nas peles foram removidas com auxílio de tesoura.

Após o preparo das peles, as mesmas foram cortadas no formato circular medindo aproximadamente 3 cm de diâmetro, cobertas com filme plástico e armazenadas em refrigerador sob temperatura de -20°C até o momento da realização dos experimentos que avaliaram a penetração e/ou permeação cutânea da DXM.

Foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz acopladas ao sistema automatizado Hanson Vision[®] MICROETTE[™] Plus (Chatsworth, EUA). O meio receptor foi composto por Tween[®] 80 0,02% (m/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 à temperatura de 32°C (± 1) em agitação magnética constante a 350 rpm.

Para execução do experimento, as peles foram descongeladas e, ao alcançar temperatura ambiente, foram hidratadas ao serem submersas em água ultrapura por um período de duas horas. Em seguida, foram adicionadas nas células de difusão (previamente preenchidas com meio receptor) com a face composta pelo estrato córneo voltada para o compartimento doador e, por ultimo, amostras de gel de DXM livre (Gel DXM), gel de DXM incorporada em CLN (Gel CLN-DXM) e creme de acetato de dexametasona 0,1% genérico em quantidades suficientes para se obter 100 μg de DXM foram adicionadas sobre as peles e distribuídas uniformemente sobre uma área correspondente à $1,86\text{ cm}^2$.

Em determinados tempos (1, 2, 3, 4, 5, 8 e 12 horas) 2 mL (1 mL de *rinse* e 1 mL para análise) do meio receptor foi coletado de cada célula e, imediatamente após a coleta, o mesmo volume de meio receptor fresco foi devolvido. Os experimentos foram realizados em sextuplicata.

Após 12 horas de experimento, as peles foram retiradas das células de difusão, lavadas com água ultrapura, secas com papel macio para remoção do excesso de formulação e dispostas, com a face compreendida pelo EC voltada para cima, em um suporte de superfície lisa e limpa.

Posteriormente, a área que sofreu penetração e/ou permeação da DXM foi delimitada com o auxílio de fitas adesivas coloridas e, então, o estrato córneo desta área foi removido utilizando-se a técnica de *tape stripping* através de 20 remoções com fitas adesivas 3M[®] (Sumaré, Brasil), modelo Durex[®] Transparente.

As fitas provenientes do *tape stripping* e a porção de pele remanescente recortada em pequenos pedaços com auxílio de tesoura foram acondicionadas em tubos plásticos de 15 mL com tampa para posterior extração da DXM.

A DXM foi extraída das amostras de EC e pele remanescente por meio da adição de 2,5 mL de fase móvel, sonicação em banho de ultrassom por 60 minutos, agitação em agitador de tubos tipo vórtex por 1 minuto, centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos e, por ultimo, filtração em filtros de PVDF Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV com poro de 0,22 μm e acondicionadas em *vials*.

As amostras de meio receptor obtidas nos tempos pré determinados foram filtradas em filtros de PVDF Merck-Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha) modelo Milex-GV com poro de 0,22 μm e acondicionadas em *vials*.

A quantificação da DXM foi realizada em CLAE acoplado a detector UV de acordo com a metodologia descrita na subseção 4.3.5. Os resultados foram expressos em massa de DXM (μg) por área de pele (cm^2).

A análise estatística da diferença, referente à concentração acumulada de DXM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) encontrada no EC, pele remanescente e meio receptor após 12 horas de experimento, entre os grupos avaliados foi realizada através de ANOVA seguida pela avaliação das diferenças entre as medias pelo teste *t*. Diferenças entre as médias com valor de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5 Resultados e discussão

5.1 Caracterização físico-química do óleo de pracaxi

5.1.1 Composição de ácidos graxos

A metodologia utilizada para determinação da composição de ácidos graxos requereu preparo prévio da amostra. Por isso, os ácidos graxos presentes no óleo de pracaxi foram transformados em FAME através de uma reação de derivatização para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

A reação de derivatização transformou um ácido orgânico (COOH) em metil éster (COOCH₃) com o objetivo de torna-lo adequado para análise por CG, pois aumenta a volatilidade do mesmo. Além de aumentar a simetria dos picos no cromatograma e diminuir a reatividade da amostra, tornando os resultados da análise mais precisos. A derivatização foi promovida por meio de uma reação de esterificação (ORATA, 2012).

A metilação do éster de ácido graxo foi promovida pelo BF₃ em solução metanólica. A reação está representada na equação Equação 5.1.



A composição de ácidos graxos do óleo de pracaxi pode ser observada na Tabela 18. Observou-se que os ácidos graxos majoritários no óleo de pracaxi foram: ácido linoleico (12,20 %), ácido oleico (48,89 %), ácido behênico (17,11 %) e ácido lignocérico (11,51 %), que corresponderam a aproximadamente 90 % da composição total de ácidos graxos do óleo de pracaxi.

O cromatograma dos FAMEs obtidos do óleo de pracaxi pode ser observado na Figura 28.

Além destes, os ácidos láurico (0,25 %), mirístico (0,29 %), palmítico (2 %), linolênico (0,13 %) esteárico (3,25 %), eicosenóico (1,48 %), araquidônico (1,16 %) e erúcico (0,75 %) foram identificados e quantificados em relação à área total dos picos do cromatograma.

A proporção de ácidos graxos saturados foi de 36,51 %, monoinsaturado 51,14 % e polinsaturado 12,35 %, conforme apresentado pela Tabela 18.

A composição de ácidos graxos do óleo de pracaxi obtida neste trabalho foi semelhante à encontrada por SANTOS COSTA et al. (2013) utilizando a mesma metodologia para derivatização dos ácidos graxos (BRÜHL, 1997).

SANTOS COSTA et al. (2013) relataram que a composição majoritária de ácidos graxos presentes no óleo de pracaxi é composta por ácido behênico, oleico, linoleico e lignocérico, que juntos, somaram 96 % da composição de ácidos graxos do óleo. A alta concentração de ácido behênico (16 %) também foi mencionada.

O ácido oleico é o principal responsável pela proporção de 51,14 % de ácidos graxos monoinsaturados presentes no óleo de pracaxi. Esta concentração de monoinsaturados encontra-se abaixo das obtidas nos óleos de oliva (71,3 %) e canola (65,2 %). Entretanto,

Tabela 18 – Composição de ácidos graxos (%) do óleo de pracaxi.

Ácido graxo	Nome e fórmula molecular	Quantidade (%)
12:0	Ácido láurico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0,247
14:0	Ácido mirístico (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	0,290
16:0	Ácido palmítico (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	2,004
18:3	Ácido linolênico (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	0,134
18:2	Ácido linoleico (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	12,208
18:1	Ácido oleico (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	48,896
18:0	Ácido esteárico (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	3,254
20:1	Ácido eicosenóico (C ₂₀ H ₃₈ O ₂)	1,482
20:0	Ácido araquidônico (C ₂₀ H ₃₂ O ₂)	1,163
22:1	Ácido erúcico (C ₂₂ H ₄₂ O ₂)	0,758
22:0	Ácido behênico (C ₂₂ H ₄₄ O ₂)	17,156
24:0	Ácido lignocérico (C ₂₄ H ₄₈ O ₂)	11,516
Proporção de ácidos graxos saturados, mono e polinsaturados		
	Saturado	36,51 %
	Monoinsaturado	51,14 %
	Polinsaturado	12,35 %

Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: A coluna denominada “Ácido graxo” representada por $a : b$, significa: a = quantidade de átomos de carbono e b = número de insaturações.

é maior que as encontradas em outros óleos de origem natural como por exemplo: arroz (40,8 %), soja (24,3 %), milho (34 %) e girassol (23 %) (SANTOS; SANTOS; SOUZA, 2005).

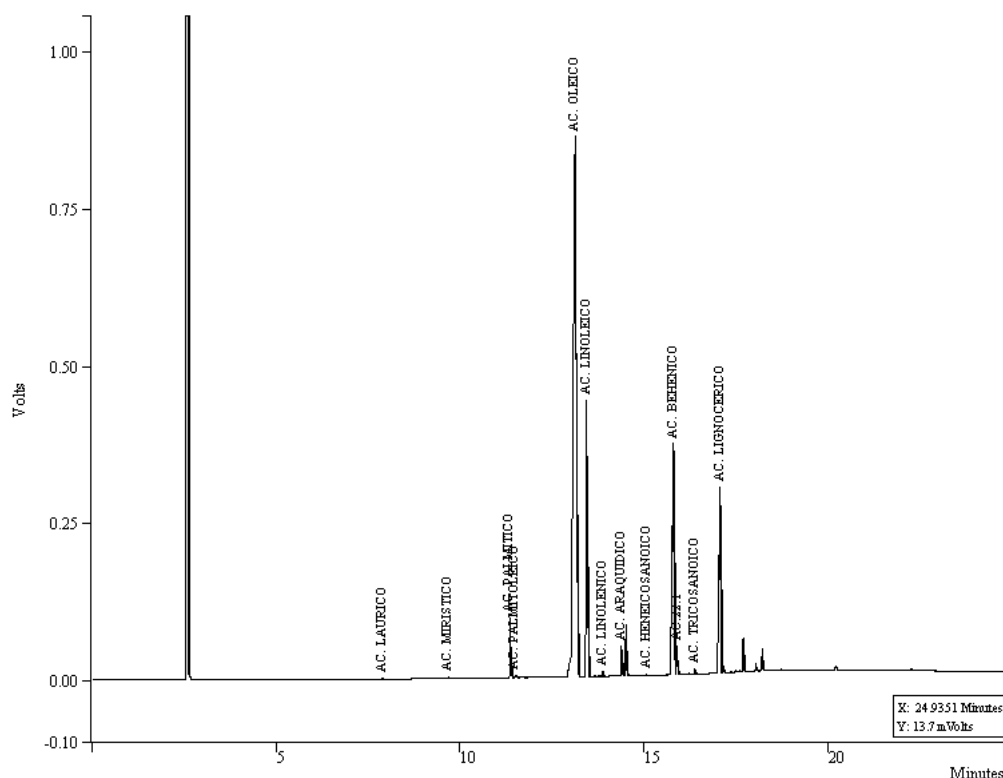
Ryan et al. (2006) determinaram a composição de ácidos graxos das amêndoas de castanha do Brasil, noqueira-pecã, pinhão, pistache e caju. Especificamente, a concentração de ácido oleico dentre as espécies avaliadas encontrou-se entre 29,09 % (castanha do Brasil) e 58,19 % (pistache).

Rodrigues, Darnet e Silva (2010) determinaram a composição de ácidos graxos das polpas de frutos da região amazônica: buriti, patawa, tucuma, mari e inaja. Dentre as polpas avaliadas, a composição de ácido oleico avaliadas situaram-se entre 52,40 % (Inaja) e 76,70 % (Patawa).

Pode-se observar que a concentração de ácido oleico (C18:1) encontrada no óleo de pracaxi (48,89 %) situa-se em níveis semelhantes ao da maioria das amêndoas e frutos avaliados nos trabalhos citados.

Óleos vegetais ricos em ácido oleico, também conhecido como ômega-9, são de grande interesse da indústria alimentícia e farmacêutica. Este ácido graxo de cadeia contendo 18 carbonos, uma ligação dupla e o grupo funcional COOH participa em diversos

Figura 28 – Cromatograma dos FAMEs obtidos do óleo de Pracaxi



Fonte: produzido pelo autor.

processos metabólicos e tem uma função importante na síntese de hormônios.

Os ácidos graxos polinsaturados linoleico (ômega-6) e linolênico (ômega-3), também estão presentes no óleo de pracaxi, mas em menor quantidade (12,20%) e (0,13%, respectivamente). Estes ácidos graxos participam de funções metabólicas essenciais, uma vez que não é sintetizado pelo organismo.

A inclusão dos mesmos na dieta são comprovadamente importantes na prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II (MARTIN et al., 2006). A proporção de ácidos graxos polinsaturados (12,35%) encontrada no óleo de pracaxi é semelhante à encontrada no óleo de oliva (12,7%) (SANTOS; SANTOS; SOUZA, 2005).

(KIM et al., 2010) realizaram a determinação de ácidos graxos de diversos óleos vegetais e determinaram a composição média de ácidos graxos saturados e insaturados entre 12% a 22% e 28% a 88%, respectivamente.

O óleo de pracaxi apresenta uma das maiores concentrações de ácido behênico na natureza (FUNASAKI et al., 2016). Segundo Brondz (2002) o ácido behênico $C_{22}HO_2$ é um constituinte lipídico minoritário da maioria das sementes e leite de animais. Isto demonstra que o óleo da semente de pracaxi é membro de um pequeno grupo de óleos vegetais ricos em ácido behênico.

O óleo obtido de *lotus plumule* contém em sua composição de ácidos graxos cerca

de 6,75% de ácido behênico, menos da metade do que foi encontrado no óleo de pracaxi (BI et al., 2006).

O óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.), obtido da região de cerrado no Brasil, possui em sua composição cerca de 2,6% de ácido behênico (TAKEMOTO et al., 2001). O óleo de sementes de romã, apenas 0,3% (NICULAE et al., 2014).

5.1.2 Determinação de densidade, viscosidade dinâmica e cinemática.

Viscosidade dinâmica é a capacidade de um fluido oferecer resistência às tensões de cisalhamento, ou seja, é a relação entre a tensão de corte aplicada e a taxa de cisalhamento de um líquido. Esta medida determina o grau de resistência do fluido à força de cisalhamento, em outras palavras, a dificuldade do fluido em escoar.

A viscosidade cinemática é calculada a partir dos resultados obtidos da viscosidade dinâmica e densidade (massa específica), portanto, é a razão entre a viscosidade dinâmica e densidade do óleo. A viscosidade cinemática depende da densidade, por isso, é importante determinar a variação da densidade de acordo com a temperatura (POLING; PRAUSNITZ; O'CONNELL, 2000; MARANGONI; NARINE, 2002).

Conforme observado na Tabela 19, a viscosidade dinâmica do óleo de pracaxi a 100 °C sofreu uma redução de mais de 8 vezes em comparação àquela medida a 30 °C, pois regrediu de 65,75 mPa/s a 30 °C para 7,77 mPa/s a 100 °C.

A viscosidade cinemática acompanhou a mesma tendência, no entanto, com uma pequena diferença devido à relação da mesma com a densidade do óleo na temperatura analisada. Ainda na Tabela 19 é possível verificar que a densidade variou entre 0,90 g/cm³ a 30 °C e 0,85 g/cm³ a 100 °C.

Tabela 19 – Densidade, viscosidades dinâmica e cinemática do óleo de pracaxi no intervalo de 30 °C à 100 °C.

Temperatura (°C)	Viscosidade dinâmica (mPa/s)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Densidade (g/cm ³)
30	65,75	72,99	0,90
40	39,90	44,64	0,89
50	27,98	31,54	0,88
60	20,43	23,20	0,88
70	15,43	17,66	0,87
80	11,99	13,83	0,86
90	9,55	11,09	0,86
100	7,77	9,09	0,85

Fonte: Produzido pelo autor.

A correlação entre o aumento da temperatura e diminuição da densidade em óleos

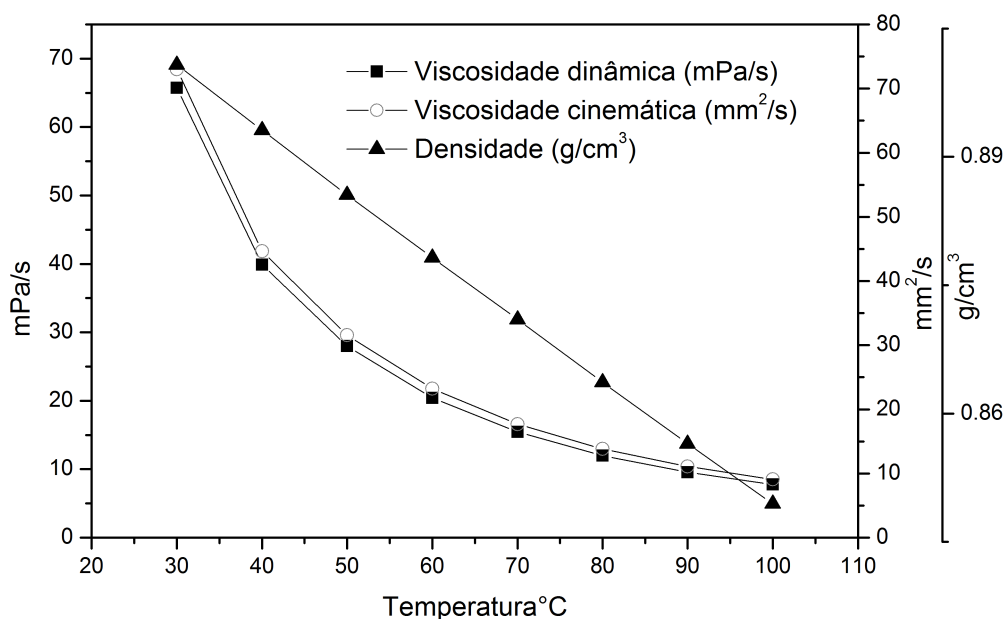
vegetais é linear, podendo ser representada pela Equação 5.2, onde ρ é a densidade em g/cm^3 , T corresponde à temperatura em $^{\circ}\text{C}$ e a e b são o intercepto e a inclinação da reta, respectivamente (ESTEBAN et al., 2012; RODENBUSH; HSIEH; VISWANATH, 1999).

$$\rho = a + b \cdot T \quad (5.2)$$

A regressão linear, obtida a partir do gráfico de dispersão da temperatura (x) e densidade (y) do óleo de pracaxai no intervalo entre $30\text{--}100^{\circ}\text{C}$, resultou na equação $\rho = -6,5952 \times 10^{-7} + 0,9202$ ($R^2 = 0,9998$). A partir da equação da regressão linear foi possível determinar a densidade teórica de $0,9227 \text{ g}/\text{cm}^3$ do óleo de pracaxi à temperatura de 25°C .

A Figura 29 apresenta o gráfico da relação entre temperatura e viscosidade dinâmica, cinemática e densidade do óleo de pracaxi no intervalo entre 30°C e 100°C . Pode-se observar que a viscosidade dinâmica e cinemática diminuíram de forma não-linear em relação ao aumento de temperatura.

Figura 29 – Gráfico representando a relação entre temperatura e viscosidade dinâmica, cinemática e densidade do óleo de pracaxi no intervalo de 30°C a 100°C .



Fonte: produzido pelo autor.

A correlação não-linear entre temperatura e viscosidade também foi obtida com outros óleos vegetais (ABRAMOVIC; KLOFUTAR, 1998; YILMAZ, 2011; FASINA; COLLEY, 2008; ESTEBAN et al., 2012). Santos, Santos e Souza (2005) realizaram um estudo que verificou, além de outras características, a correlação entre o aquecimento de óleos vegetais (soja, girassol, oliva, canola, milho, arroz) e a viscosidade. Foi observado no intervalo de aquecimento entre 10°C e 80°C que a viscosidade diminuiu de forma não-linear conforme

o aumento da temperatura. Os autores atribuíram este comportamento ao aumento da vibração das moléculas e diminuição das forças intermoleculares provocado pelo incremento de temperatura, que facilitou a mobilidade das cadeias dos ácidos graxos constituintes do óleo e, conseqüentemente, o decréscimo da viscosidade.

Ainda segundo Santos, Santos e Souza (2005), a composição de ácidos graxos (monoinsaturados e polinsaturados) também tem correlação com a viscosidade de óleos vegetais. O aumento da concentração de ácidos graxos polinsaturados diminuiu a viscosidade, enquanto que, a o aumento da concentração de ácidos graxos monoinsaturados aumentou a viscosidade dos óleos vegetais avaliados. Este comportamento ocorreu devido a impossibilidade de rotação da molécula nas ligações C=C provocada pelo maior número de duplas ligações (insaturações), tornando as ligações da cadeia de ácido graxo mais rígidas e, conseqüentemente, favorecendo o fluxo e a diminuição da viscosidade do óleo. A correlação foi mais significativa para a concentração de ácidos graxos polinsaturados ($R^2 = 0,94$) do que para os monoinsaturados ($R^2 = 0,88$). Abramovic e Klofutar (1998) atribuiu a mesma justificativa para a alta viscosidade obtida no óleo de oliva em comparação aos óleos de girassol, milho e abóbora, pois o óleo de oliva apresenta ácidos graxos monoinsaturados em 75 % de sua composição. Além disto, verificou-se também uma relação inversamente proporcional entre viscosidade e índice de iodo de óleos vegetais, pois este índice indica o grau de insaturação do óleo.

A correlação entre a composição de ácidos graxos e a viscosidade de óleos vegetais também foi relatada por Kim et al. (2010), no entanto, os autores não encontraram correlação estatisticamente significativa entre a concentração de ácidos graxos insaturados ou saturados e a viscosidade de óleo vegetais, no entanto, obteve-se correlação significativa entre a concentração dos ácidos oleico (18:1) e linoleico (18:2) e a viscosidade de 7 óleos vegetais (canola, milho, semente de uva, avelã, oliva, soja e girassol). Esta correlação foi positiva para a concentração de ácidos oleico e negativa para linoleico, que são os ácidos graxos majoritários de diversos óleos vegetais (GUNSTONE, 2011; HAMM et al., 2013). Os resultados encontrados por Kim et al. (2010) foram atribuídos ao fato da dupla ligação em (C=C) provocar mudanças na conformação estrutural da cadeia carbônica do ácido graxo e, com isso, dificultar a organização espacial das mesmas resultando em um empacotamento menos organizado e, conseqüentemente, mais fluido.

A disposição dos ácidos graxos saturados dos triglicerídeos de óleos vegetais facilita a interação entre as cadeias e a ocorrência de ligações de Van de Waals que inibe o fluxo do óleo, resultando em maior viscosidade. No entanto, a presença de duplas ligações na molécula do ácido graxo provoca uma mudança na conformação da molécula, prevenindo a interação entre as cadeias e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de fluxo do óleo e diminuindo a viscosidade (ABRAMOVIC; KLOFUTAR, 1998). O tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos (peso molecular) que fazem parte da constituição do óleo é diretamente proporcional ao aumento de viscosidade (RODENBUSH; HSIEH;

VISWANATH, 1999).

O óleo de pracaxi é composto por ácidos graxos com cadeias de 18 a 24 carbonos em mais de 90 % de sua composição e cerca de 51 % da composição é do tipo monoinsaturado, 24,6 % de polinsaturados e 24,3 % de saturados (SANTOS COSTA et al., 2013). Este perfil de composição é responsável pela alta viscosidade apresentada pelo óleo de pracaxi em comparação com outros óleos vegetais.

A Tabela 20 apresenta a viscosidade, obtida nos trabalhos de Santos, Santos e Souza (2005); Brock et al. (2008) e Fasina e Colley (2008), de vários óleos vegetais em temperaturas entre 20 °C e 80 °C. Nesta tabela é possível constatar, comparando com os dados da Tabela 19 e Figura 30, que o óleo de pracaxi é mais viscoso que os demais em todas as temperaturas avaliadas. Entretanto, a diferença de viscosidade entre os óleos vegetais diminui com o aumento da temperatura, alcançando valores semelhantes em temperaturas elevadas (YILMAZ, 2011; FASINA; COLLEY, 2008).

Tabela 20 – Viscosidade dinâmica de óleos vegetais em temperaturas de 20 °C a 80 °C.

Óleo vegetal	Viscosidade dinâmica (mPa/s)						
	80 °C	70 °C	60 °C	50 °C	40 °C	30 °C	20 °C
Arroz	12,7	14,2	20,5	24,5	38,5	50,5	73,8
Soja	10,5	12,6	16,8	22,3	30,2	41,2	59,0
Canola*	10,7	–	17,9	–	33,1	–	–
Canola	11,2	14,5	18,1	25,2	33,1	50,5	73,1
Girassol*	10,4	–	16,5	–	30,2	–	–
Girassol	10,6	12,6	17	21,3	30,3	41,3	58,3
Oliva	11,5	14,9	18,7	26,2	35,3	55,4	79,7
Milho*	11,4	–	18,3	–	33,3	–	–
Milho	10,4	14,0	16,7	24,8	30,5	47,4	67,6
Algodão	–	14,0	18,0	24,6	33,4	47,3	67,7
Amêndoas	12,42	–	–	26,89	–	–	–
Semente de uva	11,98	–	–	25,27	–	–	–
Avelã	12,49	–	–	27,40	–	–	–
Amendoim	12,66	–	–	27,45	–	–	–
Cártamo	11,17	–	–	22,32	–	–	–
Noz	10,51	–	–	21,20	–	–	–

Fonte: Adaptado de (SANTOS; SANTOS; SOUZA, 2005; BROCK et al., 2008; FASINA; COLLEY, 2008).

Nota: * Adição de antioxidante ao óleo

A viscosidade do óleo está relacionada com o tamanho de partícula obtido em preparações de CLN porque durante as etapas de pré-emulsão e homogeneização a alta

pressão, ao aplicar-se energia para dispersão (Ultraturrax[®]/HAP) de um sistema de dois líquidos imiscíveis, quanto menor a viscosidade destes constituintes menor será o tamanho de partícula formada (PANDOLFE, 1981).

Este não é o único parâmetro que determina o tamanho da partícula, pois outros parâmetros, como: cinética de adsorção do tensoativo à interface óleo/água, tensão interfacial entre as fases imiscíveis e energia empregada durante a dispersão também estão relacionados ao tamanho de partícula obtido (ABDEL-MOTTALEB; NEUMANN; LAMPRECHT, 2010; MITRI et al., 2011; GRAMDORF et al., 2008; STANG; SCHUCHMANN; SCHUBERT, 2001).

Ao comparar-se a viscosidade de óleos de origem vegetal com outros óleos comumente utilizados para preparação de CLN, como por exemplo, TCM e ácido oleico (28 mPa/s e 26 mPa/s a 25 °C, respectivamente, é possível verificar que os óleos vegetais possuem uma viscosidade maior e, devido a isso, a diminuição das gotículas de fase interna durante a preparação de nanopartículas lipídicas pode ser dificultada, resultando em nanopartículas de tamanho e PDI que podem afetar a estabilidade do CLN obtido (TAMJIDI et al., 2013; MITRI et al., 2011).

Entretanto, a Tabela 19 demonstra que a viscosidade do óleo de pracaxi em alta temperatura (80 °C) é semelhante a de demais óleos vegetais que já foram utilizados em preparações de CLN, como óleo de soja e de oliva (DOKTOROVÁ et al., 2010; TOKTON; PANICHAYUPAKARANANT, 2014), determinando assim a viabilidade de se usar óleo de pracaxi na preparação de CLN utilizando a metodologia de HAP à quente.

O aquecimento é um fator de possível degradação de óleo vegetais, que pode ser verificada por meio de propriedades físico-químicas como a viscosidade, por exemplo. Se houver mudanças na viscosidade de um óleo, após exposição à temperatura por determinado tempo, há indícios de degradação do mesmo (SANTOS; SANTOS; SOUZA, 2005). O aumento do tempo de aquecimento aumenta a viscosidade de óleos vegetais, provavelmente devido a reações de oxidação e polimerização.

A Figura 30 apresenta os valores de viscosidade dinâmica do óleo de pracaxi em intervalo de temperatura entre 40 °C e 100 °C obtidos em duas análises. A primeira foi realizada sem preparo prévio da amostra e a segunda foi obtida após manter o óleo a 100 °C durante o período de 1 hora. Observou-se que não houve diferença significativa nos valores obtidos de viscosidade dinâmica, mesmo após 1 hora de exposição ao aquecimento a 100 °C.

Santos, Santos e Souza (2005) realizaram um experimento semelhante com diversos óleos vegetais que foram submetidos a aquecimento e resfriamento com o objetivo de verificar se haveriam alterações nas medidas de viscosidade, que poderiam indicar degradação do óleo frente à temperatura. Os resultados obtidos mostraram que não houve alteração na viscosidade durante o processo de aquecimento e resfriamento, sugerindo então, que não houve degradação dos óleos avaliados.

A partir da observação dos resultados apresentados na Figura 30, é possível sugerir que não houve degradação do óleo de pracaxi no intervalo de temperatura entre 40 °C e 100 °C e tempo de exposição de 1 hora. Esta avaliação foi importante para verificar a estabilidade do óleo em situação análoga à etapa de preparação dos CLN através da metodologia de HAP à quente, onde o mesmo é aquecido até a temperatura de ± 90 °C. Ressalta-se que o tempo de aquecimento durante a preparação dos CLN é muito menor que o período em que o óleo foi mantido (1 hora) para verificar a possível ocorrência de mudança de viscosidade.

A degradação de um óleo vegetal, a ponto de apresentar modificações na viscosidade, ocorre em tempos de exposição prolongados e em temperaturas maiores que 100 °C. Esses resultados são obtidos em estudos que avaliam a degradação de óleos vegetais utilizados no processo de fritura de alimentos (*frying time*) por meio de reações de oxidação e polimerização, resultando em aumento da viscosidade (SANTOS; SANTOS; SOUZA, 2005; KALOGIANNI; KARAPANTSIOS; MILLER, 2011; ABDULKARIM et al., 2007).

Portanto, a exposição do óleo de pracaxi durante o período de 1 hora em temperatura de 100 °C não foi suficiente para provocar degradação do óleo. No entanto, serviu para verificar a estabilidade do mesmo em um tempo superior ao de preparação de CLN, garantindo assim que possivelmente não sofrerá degradação durante o processo de preparação de CLN através da metodologia de HAP à quente.

5.1.3 Determinação do EHL requerido

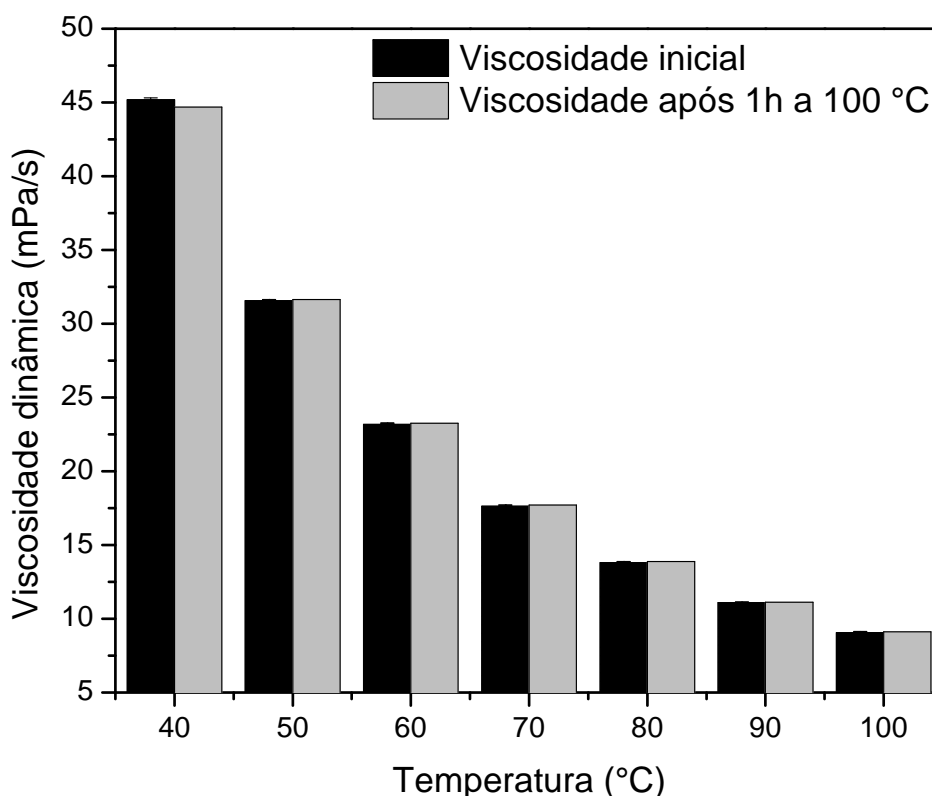
O EHL está relacionado às variações entre as porções hidrofílicas e lipofílicas da molécula de um tensoativo não-iônico e a influência das mesmas sobre a estabilidade de uma emulsão. Esta característica é representada por meio de uma escala numérica adimensional, que é útil para a escolha de tensoativos, ou misturas dos mesmos, de modo a se obter o valor de EHL requerido para a fase oleosa de uma emulsão.

Tensoativos com elevado EHL tendem a formar emulsões do tipo óleo/água e baixo EHL formam emulsões do tipo água/óleo. Isto ocorre porque, segundo a regra de Bancroft, o tensoativo é mais solúvel na fase contínua da emulsão. Por isso, os tensoativos com valores baixos de EHL são solúveis em óleo e tensoativos com elevados valores de EHL são solúveis em água (GRIFFIN, 1949; IVANOV; KRALCHEVSKY, 1997; RUCKENSTEIN, 1996; RUCKENSTEIN, 1999).

O método de determinação do EHL proposto por Griffin (1949) é criticado por causa de suas limitações frente ao método de temperatura de inversão de fases (SHINODA, 1969). No entanto, a determinação do EHL se mostra eficaz para investigação inicial do EHL requerido para óleos vegetais (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; GULLAPALLI; SHETH, 1999).

A concentração de tensoativos (Span[®] 60 e Tween[®] 80) e de fase oleosa utilizadas nos experimentos de determinação de EHL requerido para obter emulsões estáveis de óleo

Figura 30 – Gráfico da viscosidade dinâmica do óleo de pracaxi em diferentes temperaturas (40–100 °C) antes e após aquecimento a 100 °C durante 1 hora.



Fonte: produzido pelo autor.

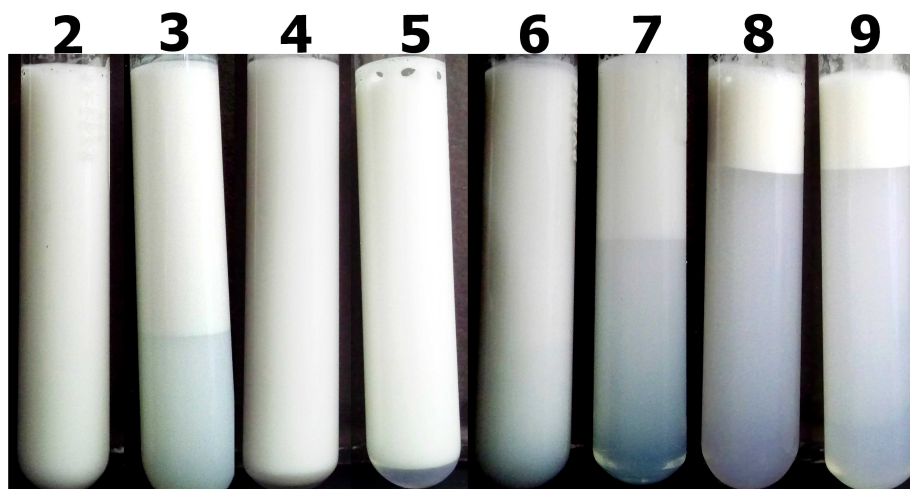
de pracaxi foi de 5 % e 10 %, respectivamente. Estas concentrações estão fundamentadas em outros estudos de determinação de EHL requerido para óleos vegetais (OLIVEIRA, 2008; BERNARDI, 2011; SEVERINO et al., 2011).

Entre as emulsões constituídas de óleo de pracaxi e a mistura de tensoativos Span[®] 60 e Tween[®] 80, a mais estável visualmente após análise macroscópica apresentou EHL em torno de 8,8 - que corresponde à proporção de 60 % de Span[®] 60 e 40 % de Tween[®] 80. As demais emulsões apresentaram instabilidade evidenciadas por separação de fases ou cremagem.

A Figura 31 apresenta as imagens das emulsões obtidas com proporções de tensoativos em diferentes valores de EHL após 7 dias de preparação. Os números que identificam as emulsões correspondem ao valor de EHL das mesmas, de acordo com a Tabela 7. Foi possível verificar sinais de instabilidade (cremagem ou coalescência) em algumas emulsões. A emulsão 2 apresentou aspecto semi-sólido (creme) e, por isso, não foi considerada na avaliação do EHL requerido para o óleo de pracaxi.

A Figura 32 apresenta as imagens das emulsões após o ensaio de estabilidade preliminar por meio de centrifugação a 1500 (A), 2000 (B) e 3500 rpm (C), respectivamente. Os números que identificam as emulsões correspondem ao valor de EHL das mesmas, de

Figura 31 – Imagem das emulsões com diferentes valores de EHL após 7 dias de preparação.



Fonte: produzido pelo autor

acordo com a Tabela 7. A emulsão 2 não demonstra visualmente cremagem ou coalescência, no entanto, a mesma apresentou consistência semi-sólida e, por isso, não foi considerada na avaliação do EHL requerido.

Os índices de cremagem apresentados pelas emulsões após 7, 14 e 28 dias da preparação estão representados na Figura 33. A emulsão com EHL 8,82 foi a que apresentou menor índice durante o período avaliado, demonstrando assim, maior estabilidade frente as demais.

O pH das emulsões foi verificado antes e após o ciclo gelo-degelo. Os valores obtidos podem ser visualizados na Figura 34. Pode-se observar que o pH apresentou pequenas variações entre as medidas no início e no final do ciclo gelo-degelo. A menor variação de pH foi apresentada pela emulsão com EHL 13,97 (0,02) e a maior pela emulsão com EHL 8,82 (1,16).

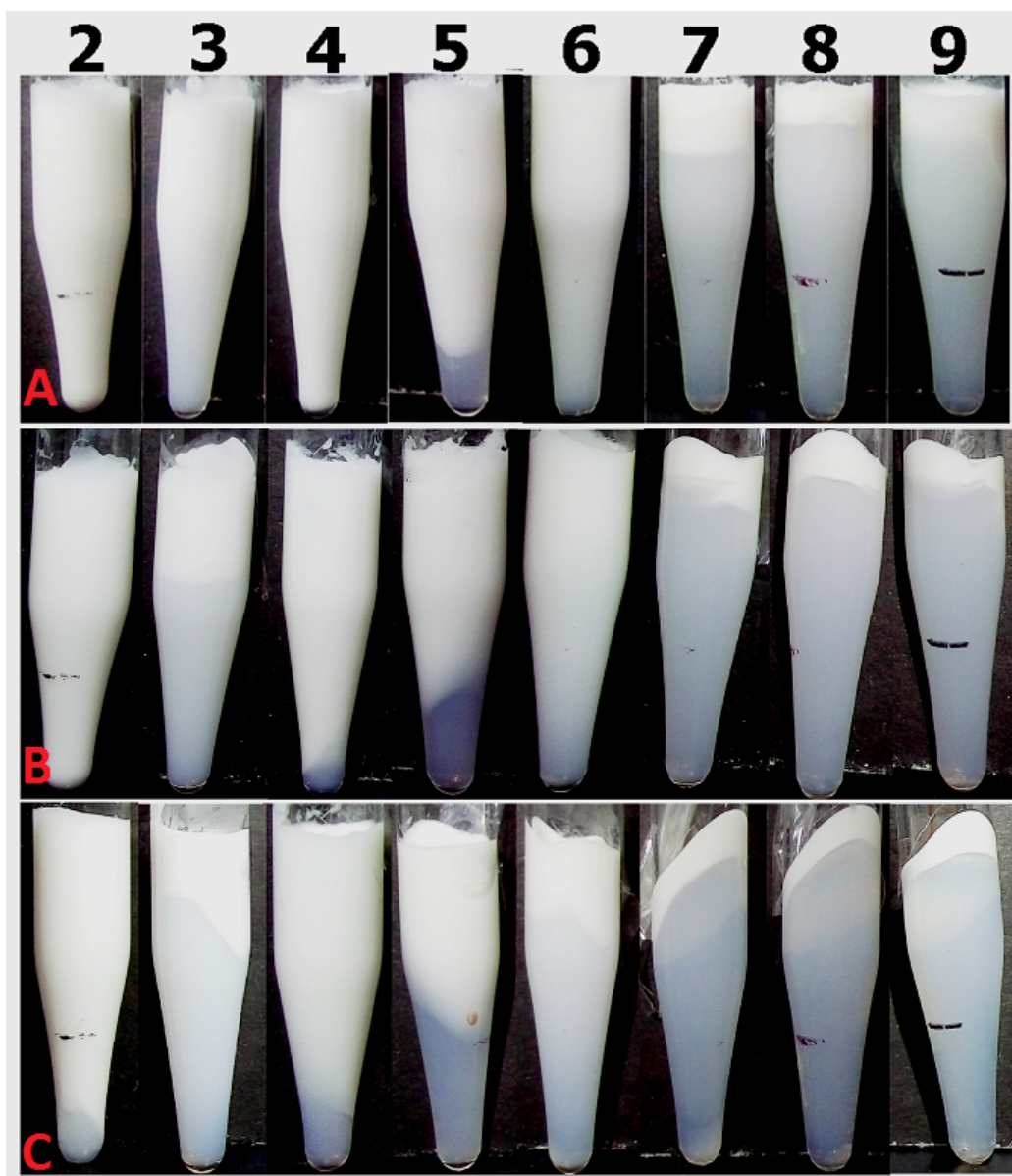
O resultado obtido referente ao EHL requerido para o óleo de pracaxi está alinhado com o EHL requerido encontrado para outros óleos vegetais. Maruno (2009) determinou o EHL 8,0 para obtenção de nanoemulsões estáveis de óleo de gergelim e óleo de framboesa utilizando os tensoativos não-iônicos óleo de rícino etoxilado 30OE (EHL 11,7) e monooleato de sorbitano (EHL 4,3).

Em outro estudo, Pereira (2008) determinou também o EHL 8,0 para obtenção de nanoemulsões estáveis dos óleos de oliva e semente de uva utilizando os tensoativos não-iônicos Ultroil[®] R300 e Span[®] 80.

A mistura dos tensoativos Span[®] 60 e Tween[®] 80 na proporção 60:40, que resultou em EHL 8,82, se mostrou adequada para a estabilização de emulsões O/A de óleo de pracaxi.

Esta estabilidade é resultado de um valor de EHL compatível com a fase oleosa

Figura 32 – Imagem das emulsões de óleo de pracaxi após centrifugação a 1500, 2000 e 3500 rpm.



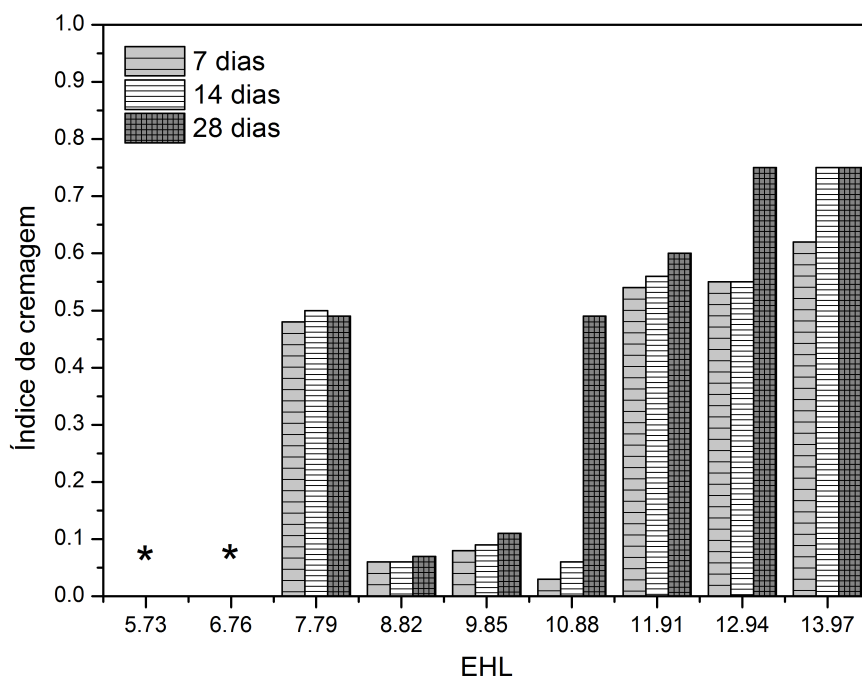
Fonte: produzido pelo autor.

(óleo de pracaxi) e também a maior estabilidade promovida à emulsão pela utilização de uma mistura de tensoativos com características opostas (hidrofílico e lipofílico), pois cada tipo de tensoativo irá se adsorver fortemente à fase correspondente, formando um filme mais coeso na interface O/A (AULTON, 2005; LACHMAN et al., 2001).

5.1.4 Diagrama de fases pseudoternário

A relação entre a proporção das fases do diagrama pseudoternário e a classificação, de acordo com o estado físico, cor e tipo de dispersão obtida, pode ser verificada no gráfico de contorno representado na Figura 35.

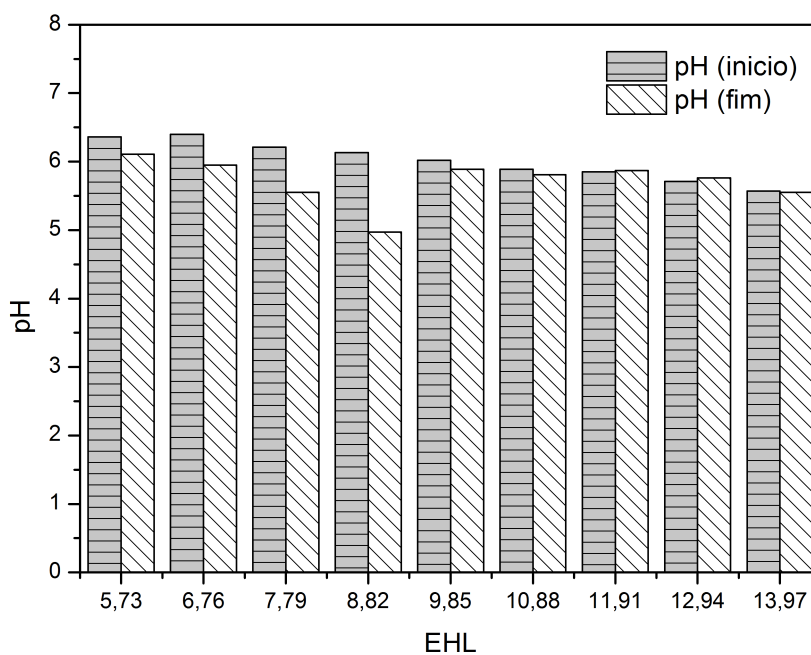
Figura 33 – Gráfico com índices de cremagem apresentados pelas emulsões de óleo de pracaxi em 7, 14 e 28 dias após a preparação.



Nota: * emulsão com consistência semi-sólida

Fonte: produzido pelo autor.

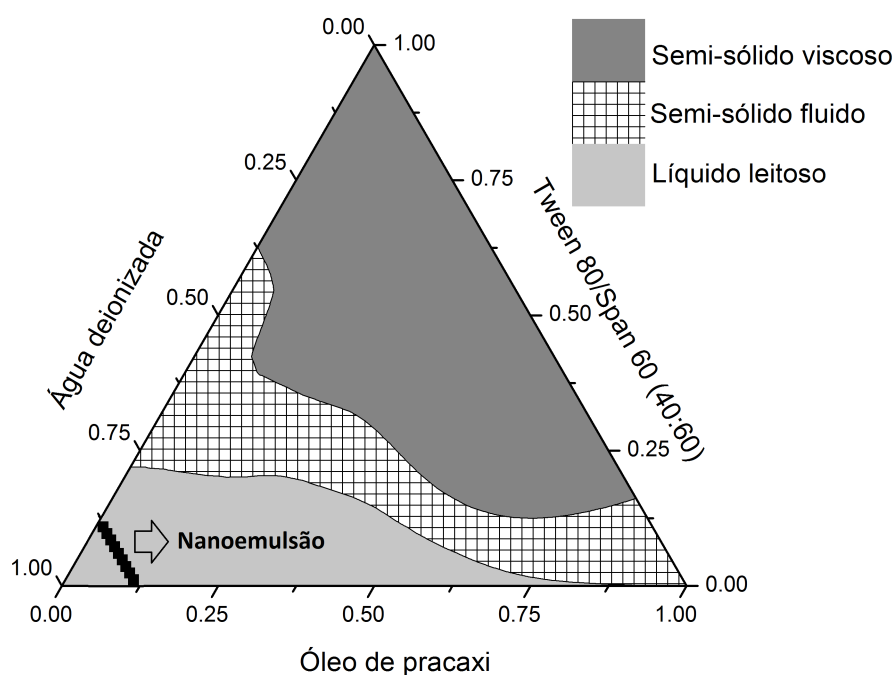
Figura 34 – Gráfico com valores de pH apresentados pelas emulsões antes e após o ciclo gelo-degelo.



Fonte: produzido pelo autor.

Através da análise do gráfico, é possível conhecer os tipos de emulsões obtidas e as respectivas regiões no diagrama pseudoternário. Todas as regiões apresentaram dispersões com características de emulsão e não foi observado separação de fases. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de separação de fases, pois o aspecto semi-sólido com alta viscosidade, observado em alguns pontos do diagrama ternário, pode ter evitado a ocorrência da separação de fases logo após o preparo da dispersão.

Figura 35 – Diagrama de fases pseudoternário das formulações avaliadas.



Fonte: produzido pelo autor.

A região de interesse compreendeu a área relativa à emulsões com aspecto líquido leitoso. Foi possível obter emulsões com este aspecto em formulações com proporção de água a partir de 38 %.

Dentro da área de interesse, constatou-se em algumas formulações a ocorrência de gotículas de fase interna em escala nanométrica (nanoemulsão). As formulações avaliadas apresentaram tamanho de gotícula de fase interna entre $131,6 \pm 2,4$ nm e $258,3 \pm 4,5$ nm.

A proporção de tensoativos utilizada, além de promover estabilização do sistema emulsionado, possibilitou a obtenção de sistemas em escala nanométrica.

O tamanho da região no diagrama correspondente à nanoemulsão depende da capacidade dos tensoativos empregados em diminuir a tensão superficial durante a dispersão das fases e a quantidade de energia empregada no processo de preparação (SARFARAZ et al., 2016; SHAKEEL et al., 2007).

A metodologia de preparação das emulsões utilizou a sonicação em sonda de

ultrassom, que é uma das metodologias que empregam alta energia para preparação de emulsões, nanoemulsões e microemulsões.

Entretanto, é possível obter nanoemulsões com tamanho de gotícula de fase interna menor e com maior estabilidade se forem utilizadas metodologias que empregam maior energia, como por exemplo, homogeneização à alta pressão (KIM et al., 2014; SHAKEEL et al., 2012).

Os resultados obtidos tornam o óleo de pracaxi um candidato promissor para o desenvolvimento de nanoemulsões para aplicação tópica de produtos farmacêuticos e cosméticos.

5.2 Avaliação da mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi

5.2.1 Análise térmica por DSC

A Figura 36 apresenta o DSC da cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera:óleo de pracaxi nas proporções 90:10 e 60:40. Adicionalmente, a Tabela 21 exhibe os dados referentes a temperatura do pico de fusão, temperatura *on-set* e o calor de fusão obtidos a partir das análises de DSC realizadas.

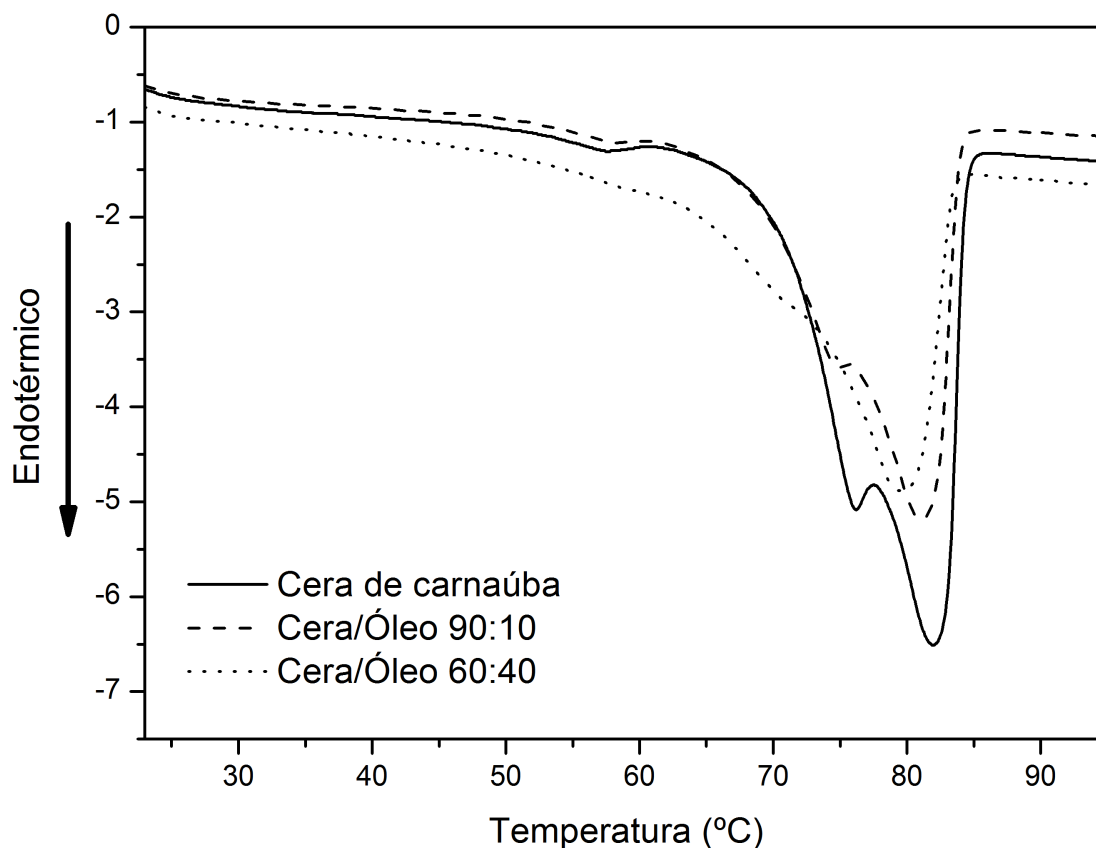
Observou-se no DSC da cera de carnaúba pura dois picos endotérmicos sobrepostos, em torno de 82 °C, relacionados a fusão da cera pura. Estes dados estão de acordo com a literatura, pois outros estudos relataram a temperatura de fusão da cera de carnaúba no intervalo entre 80 °C e 86 °C (ROSSAN, 2011; LACERDA, 2009; MILANOVIC et al., 2010; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006b; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006a; CHEN; HUANG; PANG, 2013).

As misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções 90:10 e 60:40 apresentaram evento endotérmico relacionado a fusão em temperaturas um pouco menores que da cera de carnaúba pura, 81 °C e 79 °C, respectivamente. A diminuição da temperatura de fusão foi proporcional ao incremento de óleo de pracaxi na mistura física cera de carnaúba/óleo de pracaxi. Esta observação foi atribuída à diminuição da organização das cadeias lipídicas que a adição de óleo de pracaxi proporciona à mistura física cera de carnaúba/óleo de pracaxi (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006b; SEVERINO et al., 2011).

Em um estudo que a mistura do lipídio sólido Compritol® 888 ATO e o lipídio líquido alfa tocoferol (vitamina E) foi avaliada, Souto, Mehnert e Müller (2006) constataram que o incremento de alfa tocoferol na proporção da mistura com Compritol® 888 ATO provocou a diminuição da temperatura de fusão da mistura em comparação ao lipídio sólido puro. A presença de 10 % de alfa tocoferol na mistura diminuiu a temperatura de fusão em 5,1 °C e com 40 % de óleo, diminuiu em 23,3 °C.

Também foi observado nos eventos endotérmicos de fusão da Figura 36, que houve diminuição da altura do pico e alargamento do evento endotérmico das misturas binárias

Figura 36 – Gráfico de DSC da cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.



Fonte: produzido pelo autor.

Tabela 21 – Pico de fusão, temperatura *on-set* e calor de fusão da cera de carnaúba pura e das misturas binárias de cera:óleo de pracaxi nas proporções 90:10 e 60:40.

Amostra	Pico fusão (°C)	Temperatura <i>on-set</i> (°C)	Entalpia (J/g)
Cera de carnaúba	81,98	71,05	-183,86
Cera:óleo (90:10)	81,08	72,66	-146,86
Cera:óleo (60:40)	79,63	73,03	-97,86

Fonte: Produzido pelo autor.

em comparação com a cera de carnaúba pura, proporcional ao aumento da quantidade de óleo de pracaxi na mistura, que resultou em diminuição dos valores correspondentes ao calor de fusão apresentados na Tabela 21. O calor de fusão está relacionado de forma inversamente proporcional à organização da estrutura cristalina, ou seja, quanto menor o calor de fusão menos organizada a estrutura cristalina da amostra (SOUTO; MEHNERT; MÜLLER, 2006; KOVACEVIC et al., 2011).

A diminuição da temperatura e calor de fusão estão possivelmente relacionados

com o surgimento de arranjos polimórficos com menor organização devido a adição de óleo nas misturas binárias. Os novos arranjos polimórficos podem ser formas cristalinas do tipo α , β' e β_i , que possuem maior energia e são menos estáveis e, por isso, apresentam ponto de fusão em temperaturas menores (KOVACEVIC et al., 2011; SEVERINO et al., 2011; SIEKMANN; WESTESEN, 1994; FREITAS; MÜLLER, 1999; JUNYAPRASERT et al., 2009).

Kovacevic et al. (2011) realizaram experimentos de caracterização de misturas dos lipídios Cutina[®] CP (palmitato de cetila) e Miglyol[®] 812 (triglicerídeos de cadeia média) e verificaram a influência da adição do Miglyol[®] 812 na temperatura de fusão da mistura lipídica obtida. Os autores obtiveram o mesmo comportamento apresentado pela mistura de quantidades crescentes de óleo de pracaxi na mistura lipídica composta por cera de carnaúba e óleo de pracaxi, obtendo diminuição da temperatura e da altura do pico de fusão, alargamento do pico e diminuição do calor de fusão das misturas conforme o incremento da proporção de lipídio líquido na mistura. Este evento foi atribuído à diminuição da cristalinidade provocada pela menor organização das cadeias lipídicas da mistura em comparação ao lipídio sólido puro (Cutina[®] CP). Os autores verificaram também que a diminuição da temperatura de fusão e a adição de Miglyol[®] 812 até a proporção de 60 % da mistura apresentou correlação linear.

A cristalinidade da mistura lipídica, em comparação ao lipídio sólido puro, pode ser quantificada através da equação Equação 5.3, onde IC é o índice de cristalinidade e pLS corresponde à proporção de lipídio sólido na mistura lipídica.

Esta equação foi proposta por Severino et al. (2011), que realizaram, entre outros experimentos, a avaliação da cristalinidade e polimorfismo de misturas de ácido esteárico e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico por meio de análise térmica por DSC e obtiveram resultados semelhantes quanto a diminuição da organização das estruturas cristalinas das misturas conforme o aumento da proporção de triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico na mistura lipídica.

$$\%IC = \frac{\text{Calor de fusão mistura lipídica (J/g)}}{\text{Calor de fusão do lipídio sólido (J/g)}} \cdot 100 \cdot pLS \quad (5.3)$$

Utilizando a Equação 5.3, as misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções 90:10 e 60:40 apresentaram índice de cristalinidade de 71,88 % e 31,93 % em comparação à cera de carnaúba pura (100 % de cristalinidade). Desta forma é possível afirmar que o aumento do calor de fusão e da cristalinidade são inversamente proporcionais à proporção de lipídio líquido na mistura lipídica.

Pode ser observado na Figura 36 que as misturas lipídicas avaliadas não apresentaram nenhum evento térmico até a temperatura de 40 °C, que sugere a permanência da mesmas no estado sólido. Esta é uma característica que define os CLN e assegura que após o processo de preparação e resfriamento do CLN não ocorra a formação de gotículas de óleo e a co-existência de uma emulsão O/A e os CLN (PARDEIKE et al., 2011).

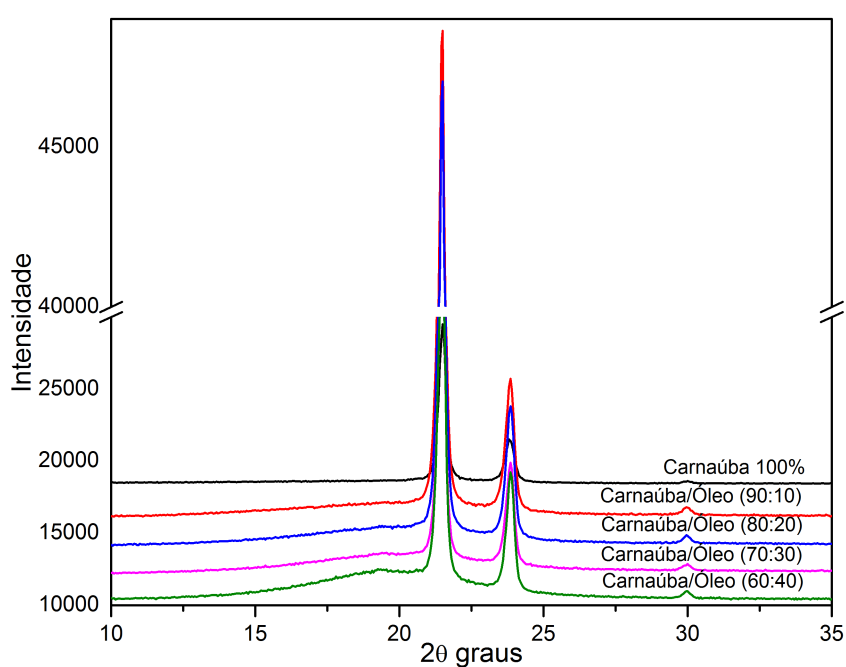
Ceras com alto ponto de fusão, como a de carnaúba (83-90 °C), permitem a adição de grandes quantidade de óleo (SOUTO; MEHNERT; MÜLLER, 2006). Fato que pode ser facilmente observado na Figura 36, onde obteve-se proporção de cera óleo de até 60:40, e mesmo assim, a mistura binária se manteve no estado sólido até a temperatura de 40 °C.

Através do DSC foi possível conhecer o comportamento térmico da cera de carnaúba pura e das misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções de 90:10 e 60:40, confirmando a possibilidade de utilização da mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi na proporção 60:40 para a preparação de CLN.

5.2.2 Difração de raios-X

Os difratogramas das amostras de cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções 90:10, 80:20, 70:30 e 60:40 estão expostos na Figura 37.

Figura 37 – Gráfico de DRX da cera de carnaúba pura e das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi.



Fonte: produzido pelo autor.

A intensidade dos picos apresentados nos padrões de DRX da Figura 37 dependem da quantidade de material submetido a análise e a disposição no porta amostra, por isso houve diferença na altura dos picos entre as amostras (SEVERINO et al., 2011).

A cera de carnaúba pura apresentou dois picos intensos de difração em torno de 2Θ 22° e 24° e um terceiro pico, com intensidade menor, em torno de 2Θ a 30° . Os picos de difração obtidos estão de acordo com a literatura (LACERDA, 2009; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMAN, 2006b; ROSSAN, 2011; BASSON; REYNHARDT, 2000).

O difratograma das misturas físicas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi nas proporções 90:10, 80:20, 70:30 e 60:40 apresentaram o surgimento de um ombro (alargamento) localizado no início do pico em torno de 2Θ 22° , que se torna mais evidente conforme o incremento da proporção de óleo na mistura binária. Os demais picos permaneceram inalterados.

O alargamento do pico em torno de 2Θ 22° , provocado pela adição de óleo de pracaxi na cera de carnaúba, foi consequência do surgimento de estruturas polimórficas na mistura, acarretando a diminuição da organização da estrutura cristalina e, conseqüentemente, a cristalinidade das cadeias lipídicas.

A hipótese de diminuição da cristalinidade da mistura física de cera de carnaúba/óleo de pracaxi foi reforçada pelo resultado apresentado na análise térmica por DSC exposta na Figura 36, pois demonstrou que proporções crescentes de óleo de pracaxi à mistura física promoveram a diminuição do ponto de fusão da mistura de cera de carnaúba/óleo de pracaxi possivelmente devido a menor organização das estruturas cristalinas.

Villalobos-Hernández e Müller-Goymann (2006b) avaliaram por meio de DRX e DSC a consequência da adição do lipídio líquido oleato de decila em cera de carnaúba para obtenção de misturas físicas e obtiveram resultados semelhantes em relação a diminuição da organização das estruturas cristalinas das misturas conforme o aumento da proporção de óleo na mistura de cera:óleo.

Os resultados obtidos pelos autores citados também foram confirmados por meio de análise térmica por DSC, onde foi verificado a diminuição do ponto de fusão das amostras de misturas físicas conforme o incremento de oleato de decila na mistura.

LACERDA (2009) relatou a diminuição de intensidade e alargamento de picos de DRX, como também a diminuição do ponto de fusão obtidos por DSC de misturas físicas de cera de carnaúba acrescidas de proporções crescentes de oleato de isodecila. Os resultados obtidos foram atribuídos também a diminuição da organização das estruturas cristalinas das cadeias lipídicas da mistura binária.

As estruturas polimórficas são classificadas de acordo com o arranjo das cadeias de ácidos graxos apresentadas por glicerídeos. As conformações de maior energia, do tipo α , β' e β_i , são responsáveis pela diminuição da cristalinidade. Estas formas cristalinas são transitórias e possuem tendência a se transformarem na forma β mais organizada (cristalina), estável e de menor energia (LARSSON, 1966; SEVERINO et al., 2011).

Jenning, Thünemann e Gohla (2000) verificaram através de DRX a diminuição da organização da estrutura cristalina da mistura física de Compitrol[®] ATO 888 e Miglyol[®]

na proporção 2:1 em comparação ao Compitrol[®] ATO 888 puro e atribuíram a diminuição da cristalinidade da mistura física ao surgimento de novas estruturas polimórficas, de maior energia, β' e β_i .

A obtenção de uma mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi com matriz lipídica menos organizada (menor cristalinidade) é desejável para a preparação de CLN, pois esta característica está associada a maior eficiência de incorporação de fármaco. A estrutura menos organizada da matriz lipídica fornece espaços para a acomodação do fármaco, aumentando a eficiência de incorporação e evitando também a expulsão do fármaco incorporado na matriz lipídica durante o período de armazenamento, fato observado comumente em NLS, pois a estrutura menos cristalina dificulta a reorganização das cadeias lipídicas para a conformação de menor energia (mais cristalina) (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b).

5.3 Metodologia analítica para quantificação da dexametasona

A Tabela 22 apresenta as condições cromatográficas utilizadas no método analítico de quantificação da DXM em CLAE acoplado a detector UV. As condições cromatográficas selecionadas foram adequadas para a separação da DXM dos possíveis interferentes oriundos de componentes da formulação de CLN e também da matriz biológica (pele de orelha de porco).

Tabela 22 – Condições cromatográficas do método de quantificação da DXM por CLAE acoplado a detector UV.

Parâmetro	Configuração
Coluna	Waters [®] XBridge [™] (250 mm×4,6 mm×3,5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila/água+TFA 0,05 % (v/v) (45:55)
Fluxo	0,8 mL/min
Tempo de corrida	9 minutos
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	100 µL
Espectro PDA	200-400 nm
Pico de absorção da DXM	240 nm

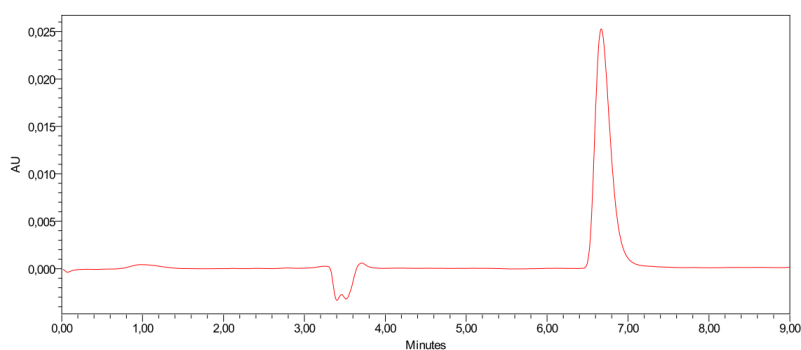
Fonte: Produzido pelo autor.

A proporção de fase móvel utilizada apresentou equilíbrio entre os solventes apolar (acetonitrila) e polar (água) (45:55) e o método pôde ser executado em temperatura ambiente (25 °C) sem a necessidade de submeter a coluna a alta temperatura, que diminui a vida útil da mesma. A pressão do sistema se manteve em aproximadamente 3000 bar, em torno de 60% da pressão máxima recomendada pelo fabricante da coluna.

O fluxo de fase móvel em 0,8 mL/min proporcionou uma corrida de 9 minutos, com o pico da DXM apresentando tempo de retenção (T_r) de 6,6 minutos. Levando em consideração o tamanho da coluna utilizada e o fluxo de fase móvel (volume morto), obteve-se o tempo de retenção ajustado ($T_{r'}$) da DXM de 3 minutos.

A Figura 38 apresenta o cromatograma típico da eluição da DXM, de acordo com as condições cromatográficas utilizadas, e a Tabela 23 exhibe as características referentes ao pico referente à DXM.

Figura 38 – Cromatograma típico da eluição da dexametasona.



Fonte: produzido pelo autor.

Tabela 23 – Parâmetros cromatográficos do pico da DXM obtido por CLAE acoplado a detector UV.

Parâmetro	Configuração	
Parâmetros	Limites recomendados	Parâmetros calculados
Pratos teóricos	>2000	5697
Fator de assimetria	<2	1,46

Fonte: Produzido pelo autor.

A obtenção de tempo de análise cromatográfica curto é importante para um método que demanda grande número de amostras como ensaios de liberação *in vitro* de DXM em membrana de acetato de celulose e penetração e/ou permeação em pele de orelha de porco.

O fator de capacidade ou retenção (k'), que representa a razão entre a permanência do soluto na fase estacionária e na fase móvel, foi determinado em aproximadamente 0,83. O k' obtido foi menor que o encontrado por Ali et al. (2013), que validaram um método de quantificação de DXM em nanopartículas poliméricas utilizando fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol (50:25:25) e obtiveram $k' > 1$.

Houve a necessidade de utilizar ácido trifluoroacético (TFA) para acidificar a fase móvel e, assim, obter assimetria adequada do pico da DXM. A utilização de fase móvel não acidificada (pH elevado) aumenta a quantidade de moléculas de DXM na forma ionizada,

que provoca a ocorrência de cauda no pico e, conseqüentemente, afeta a assimetria do mesmo.

Existem métodos analíticos por CLAE acoplado a detector UV-Vis para extração e quantificação da DXM em diversas formas farmacêuticas. Incluem-se nesse universo, por exemplo, os métodos farmacopeicos de quantificação em solução otológica, colírio e creme (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 1941).

Há também trabalhos publicados em periódicos com métodos para quantificação de DXM incorporada em micropartículas (BECK et al., 2007), nanopartículas poliméricas (BECK et al., 2003; ALI et al., 2013; GÓMEZ-GAETE et al., 2007), nanocápsulas poliméricas (FRIEDRICH; FONTANA; BECK, 2008; MARCHIORI et al., 2010; BEBER et al., 2016), microemulsões (CRISTINA et al., 2009), comprimidos (BECK, 2001), DXM complexada com ciclodextrina (LOPEZ; COLLETT; BENTLEY, 2000).

Tung, Huyen e Chi (2015) utilizaram um método por CLAE acoplado a detector UV-Vis para quantificar DXM, proveniente de ensaios de penetração/permeação em pele de camundongos. A metodologia empregada foi baseada em um método proposto por (XU et al., 2011), no entanto, não foram apresentados os critérios utilizados para validação.

Beber et al. (2016) publicaram recentemente (2016) um estudo onde foi verificada a penetração/permeação de DXM em pele abdominal de porco liberada a partir de nanocápsulas poliméricas. O método de quantificação utilizado pelos autores foi validado e apresenta grande semelhança com o método utilizado nesta tese.

Sabendo-se que o método foi previamente desenvolvido e validado em outro laboratório, verificou-se a necessidade de avaliar a reprodutibilidade do mesmo entre laboratórios e equipamentos diferentes. Além das diferenças inerentes aos laboratórios, há também mudanças entre os métodos quanto aos interferentes relacionados ao sistema carreador de fármaco. Beber et al. (2016) utilizaram nanocápsulas poliméricas, enquanto que neste trabalho se utilizou carreadores lipídicos nanoestruturados). Além disto, a localização da matriz biológica também foi diferente, abdômen no trabalho citado e orelha nesta tese.

5.3.1 Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido para a quantificação de DXM em CLN composto por cera de carnaúba e óleo de pracaxi e em matriz biológica de pele de orelha de porco se mostrou adequado e cumpriu os requisitos exigidos para validação. A Tabela 24 apresenta uma visão geral dos parâmetros avaliados e os respectivos resultados.

5.3.1.1 Seletividade

O Apêndice C apresenta os cromatogramas obtidos de amostras de CLN, EC e pele remanescente sem DXM (BRANCO) e com DXM. O tempo de retenção da DXM foi de 6,6 min com absorção máxima em 240 nm.

Tabela 24 – Visão geral dos resultados da validação do método analítico.

Parâmetro	Amostra	Resultado
Seletividade	CLN, EC e pele remanescente (n=3)	T_r 6,6 minutos, sem interferentes
Linearidade	3 curvas autênticas 7 concentrações	$y = 244242x - 4666,4$ $r^2 = 0,9999$
Intervalo	7 pontos (n=3 cada ponto)	0,1 µg/mL a 2,6 µg/mL
Limite de detecção	n=3	0,0216 µg/mL
Limite de quantificação	n=3	0,0656 µg/mL
Exatidão por recuperação	n=3 (cada concentração)	CLN: 101,42 % (média) EC: 97,83 % (média) Pele: 99,65 % (média)
Precisão intradia	n=3 (analítico) n=5 (bioanalítico)	DPR entre 0,04 % e 2,98 %
Precisão interdia	n=3 (analítico) n=5 (bioanalítico)	DPR entre 0,11 % e 4,11 %
Robustez	1,4 µg/mL (n=3) 6 condições diferentes	Média: 1,37 µg/mL (\pm 2,67 %)

Fonte: Produzido pelo autor.

Os demais picos encontrados nos cromatogramas do Apêndice C são referentes aos constituintes da matriz biológica (pele) e dos constituintes do CLN. Foi possível observar que não houveram interferências destes constituintes com o pico da DXM, mostrando assim, que o método utilizado apresenta seletividade para a DXM.

5.3.1.2 Linearidade

A curva analítica obtida para quantificação da DXM pode ser observada na Figura 39. A linearidade da curva analítica foi obtida por meio de regressão linear empregando o método dos mínimos quadrados de acordo com o exposto na subseção 4.3.5.1.2.

O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9999, indicando a linearidade da relação entre o sinal obtido pelo detector UV-Vis e a concentração de DXM no intervalo entre 0,1 µg/mL e 2,6 µg/mL. A relação entre o sinal analítico e a concentração de DXM ([DXM]) está representada na Equação 5.4.

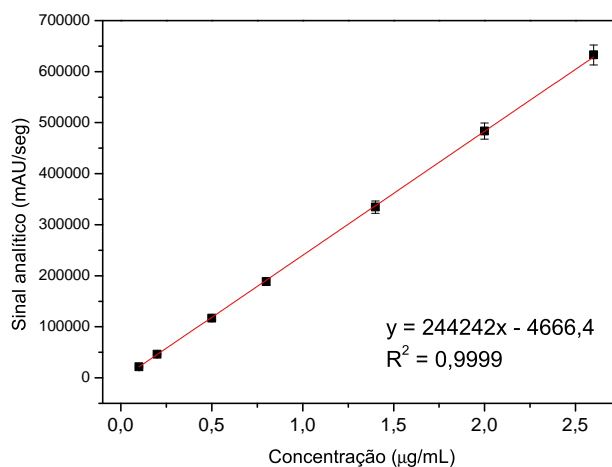
$$\text{Área do pico} = 244242 \times [\text{DXM}] - 4666,4 \quad (5.4)$$

A Figura 40 apresenta a distribuição normal dos resíduos da curva de regressão.

5.3.1.3 Limites de detecção e quantificação

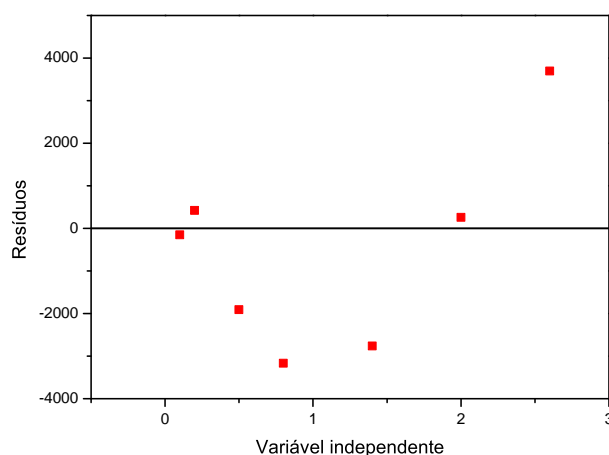
O limite de detecção de um método analítico corresponde a menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra, no entanto, não é necessariamente quantificado de forma exata. O limite de quantificação é a menor quantidade de analito

Figura 39 – Curva analítica da DXM no intervalo entre 0,1 µg/mL e 2,6 µg/mL.



Fonte: produzido pelo autor.

Figura 40 – Distribuição dos resíduos.



Fonte: produzido pelo autor.

que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas em uma amostra (TIWARI; TIWARI, 2010; BASHAW et al., 2014; BRASIL, 2003).

Os limites de detecção e quantificação da DXM foram 0,0216 µg/mL e 0,0656 µg/mL, respectivamente. Os limites obtidos são importantes para a detecção e quantificação de concentrações baixas de DXM encontradas na fase inicial do ensaio de liberação da DXM a partir dos CLN em membrana de acetato de celulose e também para identificar a possível ocorrência de permeação, mesmo de quantidades pequenas, de DXM nos ensaios de penetração/permeação em pele de orelha de porco.

Os limites de detecção e quantificação obtidos (0,0216 µg/mL e 0,0656 µg/mL, respectivamente) se mostraram maiores que os reportados por Beber et al. (2016) (0,015 µg/mL e 0,046 µg/mL, respectivamente), que desenvolveram e validaram um método analítico por

HPLC para quantificação de DXM contida em nanocápsulas poliméricas. Entretanto, o intervalo de concentração utilizado por Beber et al. (2016) foi entre 0,25 µg/mL e 3 µg/mL.

5.3.1.4 Precisão

Os resultados da avaliação da precisão do método podem ser observados na Tabela 25.

A avaliação do desvio desvio padrão relativo (DPR) da média das determinações apresentou resultados que se enquadram dentro dos limites aceitáveis de $\pm 5\%$ para métodos analíticos e $\pm 15\%$ para bioanalíticos, de acordo com o documento publicado pelo FDA e a Resolução RE 899/2003 da ANVISA, que determinam as diretrizes para ensaios analíticos e bioanalíticos (TIWARI; TIWARI, 2010; BRASIL, 2003).

Tabela 25 – Precisão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) para quantificação de DXM em CLN, estrato córneo e pele remanescente.

Teórica (µg/mL)	Precisão intradia (repetibilidade)		Precisão interdia (intermediária)	
	Experimental (µg/mL)	DPR (%)	Experimental(µg/mL)	DPR (%)
DXM em fase móvel				
0,1	0,11 ± 0,001	1,07	0,11 ± 0,002	1,41
1,4	1,38 ± 0,040	2,94	1,39 ± 0,048	3,43
2,6	2,59 ± 0,035	1,34	2,56 ± 0,078	3,03
CLN				
0,1	0,11 ± 0,001	0,88	0,11 ± 0,001	1,57
1,4	1,49 ± 0,009	0,63	1,55 ± 0,002	0,11
2,6	2,86 ± 0,001	0,05	2,75 ± 0,019	0,67
Estrato córneo				
0,1	0,11 ± 0,003	2,98	0,12 ± 0,004	3,25
1,4	1,36 ± 0,002	0,17	1,33 ± 0,013	0,95
2,6	2,62 ± 0,005	0,18	2,51 ± 0,003	0,11
Pele remanescente				
0,1	0,12 ± 0,001	0,57	0,11 ± 0,005	4,11
1,4	1,35 ± 0,019	1,39	1,30 ± 0,010	0,73
2,6	2,50 ± 0,001	0,04	2,76 ± 0,005	0,17

Fonte: Produzido pelo autor.

5.3.1.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação. A recuperação da DXM a partir do CLN, estrato córneo e pele remanescente pode ser visualizada na Tabela 26. O resultado médio foi de 101,42%, 97,83% e 99,65% para CLN, estrato córneo e pele remanescente, respectivamente.

O desvio padrão relativo da média das determinações (triplicata) encontrou-se entre 1,22 % e 6,88 %, dentro dos limites aceitáveis para métodos analíticos e bioanalíticos.

Tabela 26 – Exatidão do método analítico para quantificação de DXM em CLN, estrato córneo e pele remanescente.

Matriz	Concentração teórica DXM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recuperação	
		Média (%)	DPR (%)
CLN	0,1	105,98	1,73
	1,4	98,59	1,93
	2,6	99,71	2,56
Estrato córneo	0,1	105,52	6,88
	1,4	94,29	1,22
	2,6	93,68	1,39
Pele remanescente	0,1	105,71	4,92
	1,4	93,68	2,86
	2,6	99,57	4,44

Fonte: Produzido pelo autor.

5.3.1.6 Robustez

A avaliação da robustez do método pode ser verificada na Tabela 27. As medidas experimentais de concentração de DXM apresentaram valor médio de $1,37 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,0578$ que corresponde à 97,85 % da concentração teórica ($1,4 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Os resultados obtidos indicam que a alteração deliberada nos parâmetros avaliados não alterou significativamente a área dos picos da DXM confirmando assim a robustez do método de quantificação da DXM.

Tabela 27 – Robustez do método analítico para quantificação de DXM.

Parâmetro	Alteração	Experimental ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DPR (%)
Fluxo (mL/min)	0,76	1,44	0,25%
	0,84	1,44	4,66%
Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$)	23,7	1,32	0,02%
	26,3	1,32	0,36%
Proporção de fase móvel (ACN : H ₂ O)	(47,7:52,3)	1,33	0,62%
	(42,7:57,3)	1,36	2,76%

Fonte: Produzido pelo autor.

5.4 Solubilidade da DXM em óleo de pracaxi

A solubilidade da DXM em óleo de pracaxi foi de $190,16 \mu\text{g}/\text{mL}$. Moghimipour et al. (2013) avaliaram a solubilidade da DXM em óleo de oliva, óleo de amêndoas, Labrafac[®]

Lipophile wl 1349, Labrafac[®] Lipophile PG, Transcutol[®] P e em diferentes tensoativos e co-tensoativos: Labrasol[®], Tween[®] 80 e Capryol[®] 90.

Dentre os óleos avaliados por Moghimipour et al. (2013), a DXM apresentou maior solubilidade (9,21 mg/mL \pm 0,13) na combinação dos óleos Labrafac[®] Lipophile wl 1349:Transcutol[®] P (10:1). Os óleos de oliva e de amêndoas solubilizaram no máximo 4,12 mg/mL \pm 0,16 e 5,25 mg/mL \pm 0,27 de DXM, respectivamente.

5.5 Partição da DXM em óleo de pracaxi e água

O coeficiente de partição da DXM entre o óleo de pracaxi e água ultrapura foi determinado segundo a lei de distribuição de Nernst (*Nernst's distribution law*), que descreve a distribuição de um soluto entre dois solventes imiscíveis (SANGSTER, 1997).

De acordo com o exposto na Tabela 28, a solubilidade da DXM na fase oleosa foi 27,53 μ g/mL (\pm 0,42) e na fase aquosa 73,28 μ g/mL (\pm 1,78).

O coeficiente P , referente à razão entre a solubilidade na fração oleosa e aquosa, foi 0,3757 e o $\log P$ -0,4250. O coeficiente de partição ($\log P$) obtido demonstra que a DXM, apesar de ser classificada como lipofílica, apresentou maior afinidade pela água do que pelo óleo de pracaxi.

Tabela 28 – Solubilidade da DXM nas fases aquosa e oleosa, valor de P e coeficiente de partição ($\log P$) em temperatura de 25°C.

Fase	Solubilidade	Valor de P	$\log P$
Óleo de pracaxi	27,53 μ g/mL (\pm 0,42)	0,3757	-0,4250
Água	73,28 μ g/mL (\pm 1,78)		

Fonte: produzido pelo autor.

O coeficiente de partição ($\log P$) octanol/água da DXM, encontra-se entre 1,68 e 1,93 (SHOSHTARI; WEN; ALANY, 2008; HANSCH; LEO, 1995; TETKO et al., 2005; MACHATHA; YALKOWSKY, 2005) e o coeficiente de partição ($\log P$) octanol/tampão fosfato pH 7,4, 1,33 Einmahl et al. (1999). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura da partição da DXM com outros óleos vegetais e água.

A determinação do coeficiente de partição da DXM entre óleo de pracaxi e água é importante para o desenvolvimento de formulações (emulsões, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas), pois, através dele, sabe-se previamente a afinidade do fármaco pelo óleo de pracaxi em uma dispersão aquosa.

Além disto, o coeficiente de partição de um fármaco está relacionado à absorção percutânea do mesmo. Fármacos lipossolúveis apresentam facilidade de penetrar nas camadas da pele, entretanto, fármacos com características tanto lipofílicas quanto hidrofílicas apresentam facilidade maior.

Segundo Li et al. (2014), fármacos que apresentam maior penetrabilidade são os que apresentam afinidade semelhante pelas fases oleosa e aquosa. Por isso, a DXM pode apresentar maior facilidade de atravessar as camadas da pele e, assim, apresentar efeitos sistêmicos - indesejáveis quando se faz uso de aplicação tópica deste fármaco.

Para tentar contornar a ocorrência de efeitos sistêmicos, o uso de CLN pode ser uma alternativa. Os CLN aumentam a penetração de fármacos nas camadas superficiais da pele (epiderme), evitando assim, a absorção sistêmica (SOUTO; MÜLLER, 2008; TUNG; HUYEN; CHI, 2015).

5.6 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica requer uma série de estudos preliminares para identificar os componentes da formulação e os fatores do processo de obtenção que irão apresentar maior influência nas características do produto, não somente os fatores isolados, mas também a combinação destes podem exercer influência.

Para isso, foram utilizados delineamentos experimentais para estabelecer estas relações entre os fatores, de forma isolada ou combinada, em conjunto com análises estatísticas para a otimização da formulação (KUMAR, 2012).

A obtenção de características de tamanho, índice de polidispersão e eficiência de incorporação de fármaco adequadas para a aplicação tópica e que indiquem boa estabilidade físico-química dos CLN dependem de alguns fatores de composição e preparação como, por exemplo, concentração de tensoativos e lipídios, proporção de cera:óleo na mistura lipídica, pressão e ciclos de homogeneização (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a).

A metodologia de preparo utilizada neste trabalho foi de HAP à quente descrita por Müller, Radtke e Wissing (2002b) foi selecionada porque possui algumas vantagens como, por exemplo, fácil adaptação para utilização em larga escala, não utilização de solventes orgânicos e possibilidade de uso de grandes concentrações de lipídios na formulação.

Esta técnica apresenta uma etapa prévia de preparação de uma pré-emulsão, importante para o processo de preparação de CLN, pois as gotículas da fase oleosa devem se encontrar, pelo menos, na escala micrométrica antes da pré-emulsão ser submetida a homogeneização a alta pressão (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

A dispersão em Ultraturrax[®] a 10000 rpm durante 5 minutos, de um volume correspondente a 250 gramas de formulação de CLN, foi determinante para o cisalhamento eficiente das fases oleosa e aquosa e a obtenção de gotículas na escala micrométrica ou menor.

Além de parâmetros do processo, como a rotação e tempo de dispersão com Ultraturrax[®], parâmetros da formulação também não foram alterados durante os planejamentos experimentais, por exemplo, proporção de tensoativos.

5.6.1 Seleção da proporção de tensoativos utilizados na formulação de CLN

O EHL requerido para o óleo de pracaxi é de 8,8, de acordo com os resultados apresentados na subseção 5.1.3, e a cera de carnaúba apresenta EHL requerido de 12 (MILANOVIC et al., 2010). Portanto, de acordo com as informações referentes ao EHL requerido dos constituintes lipídicos, a seleção da proporção de tensoativos utilizados na formulação de CLN foi realizada a partir da Equação 4.3 (subseção 4.3.3).

Os resultados obtidos de EHL requerido, de acordo com a Equação 4.3, para as proporções de cera:óleo utilizadas nas formulações preparadas nos planejamentos experimentais podem ser visualizadas na Tabela 29, onde é possível verificar que os valores de EHL requerido se encontraram entre 10,72 e 11,68.

A mistura dos tensoativos Tween[®] 80 e Span[®] 60 na proporção 60:40 apresenta EHL de 10,88, de acordo com a Equação 4.1. Esta proporção de tensoativos foi selecionada para ser utilizada em todas as formulações, obtendo assim um valor de EHL dentro do intervalo de EHL requerido apresentado na Tabela 29.

A utilização de uma mistura de tensoativos com EHL dentro do intervalo de EHL requerido apresentado na Tabela 29 favorece a obtenção de uma dispersão termodinamicamente estável e homogeneamente dispersa (GRIFFIN, 1949; ICI AMERICAS, 1984).

Tabela 29 – EHL requerido das misturas cera:óleo utilizadas nas formulações preparadas nos planejamentos experimentais.

Proporção cera de carnaúba:óleo de pracaxi	EHL requerido
90 : 10	11,68
75 : 25	11,20
60 : 40	10,72

Fonte: Produzido pelo autor.

5.6.2 Planejamento experimental fracionado de resolução IV

Os resultados dos 19 experimentos realizados no planejamento fatorial fracionado podem ser visualizados na Tabela 30. O tamanho médio das partículas de CLN obtidas variou entre 153,3 nm (formulação 13, Tabela 30) e 2228 nm (formulação 7, Tabela 30).

O tamanho médio de 153,3 nm do CLN obtido na formulação 13 apresenta vantagens como, por exemplo, possibilidade de maior penetração nas camadas da pele e maior área de contato para interação com o local de ação (BHASKAR et al., 2009; RICCI et al., 2005; JENNING; SCHÄFER-KORTING; GOHLA, 2000). Entretanto, a formulação 7 apresentou tamanho médio de partícula (2228 nm) e PDI (1) incompatíveis com a faixa de leitura do equipamento Malvern modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra). A

Tabela 30 – Formulações de CLN de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo DXM obtidas a partir de planejamento fatorial 2^{6-2}_{IV} .

Formulação	Respostas		
	Tamanho (nm)	PDI	EE (%)
1	194,7	0,289	7,7
3	461,1	0,492	41
4	182,9	0,141	38,2
5	253,0	0,394	0,7
6	294,3	0,359	21,8
7	2228	1	18,3
8	249,8	0,296	0
9	207,6	0,252	34,9
11	322,4	0,480	46,4
12	291,5	0,433	26,7
13	153,3	0,181	28,6
14	154,7	0,253	13,1
15	220,5	0,289	39,3
17	268,5	0,257	12,8
18	274,4	0,395	50,6
19	195,1	0,188	16,7
pontos centrais			
2	197,3	0,263	22,8
10	183,8	0,146	32,1
16	186,1	0,161	30,5

Fonte: Produzido pelo autor.

formulação 7 apresentou separação de fases e, por isso, esta leitura errônea de tamanho e PDI. Além disto a formulação 7 se mostrou inadequada para aplicação tópica da DXM devido a instabilidade apresentada.

De acordo com o gráfico da resposta tamanho na Figura 41 e os dados da Tabela 31, todos os fatores (principais e de interação entre dois e três fatores) foram significativos para a resposta tamanho. Os fatores principais que influenciaram significativamente o aumento do tamanho médio dos CLN foram: %LIP, CICLOS e PRESSO. Os fatores %DXM, %TENS e %LEO foram significativos para promover a diminuição do tamanho médio dos CLN.

Ao analisar a Figura 41, pode-se observar no gráfico da resposta tamanho que o fator %LIP promoveu o aumento do tamanho médio dos CLN. Este efeito pode ser atribuído ao aumento da tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa e ao incremento

Tabela 31 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta tamanho.

fator		Confundimento	Contraste	p
Efeitos principais				
A	%DXM	BCE DEF	-215,550	0,000281
B	%TENS	ACE CDF	-272,700	0,000175
C	%LIP	ABE BDF	312,700	0,000133
D	%ÓLEO	AEF BCF	-305,150	0,000140
E	CICLOS	ABC ADF	246,150	0,000215
F	PRESSÃO	ADE BCD	183,500	0,000387
Interações				
	AB	CE	280,325	0,000166
	AC	BE	-220,725	0,000268
	AD	EF	185,825	0,000377
	AE	BC DF	-230,175	0,000246
	AF	DE	-272,375	0,000176
	BD	CF	224,025	0,000260
	BF	CD	-278,175	0,000168
	ABD	ACF BEF CDE	-250,250	0,000208
	ABF	ACD BDE CEF	280,325	0,000166

Fonte: Produzido pelo autor.

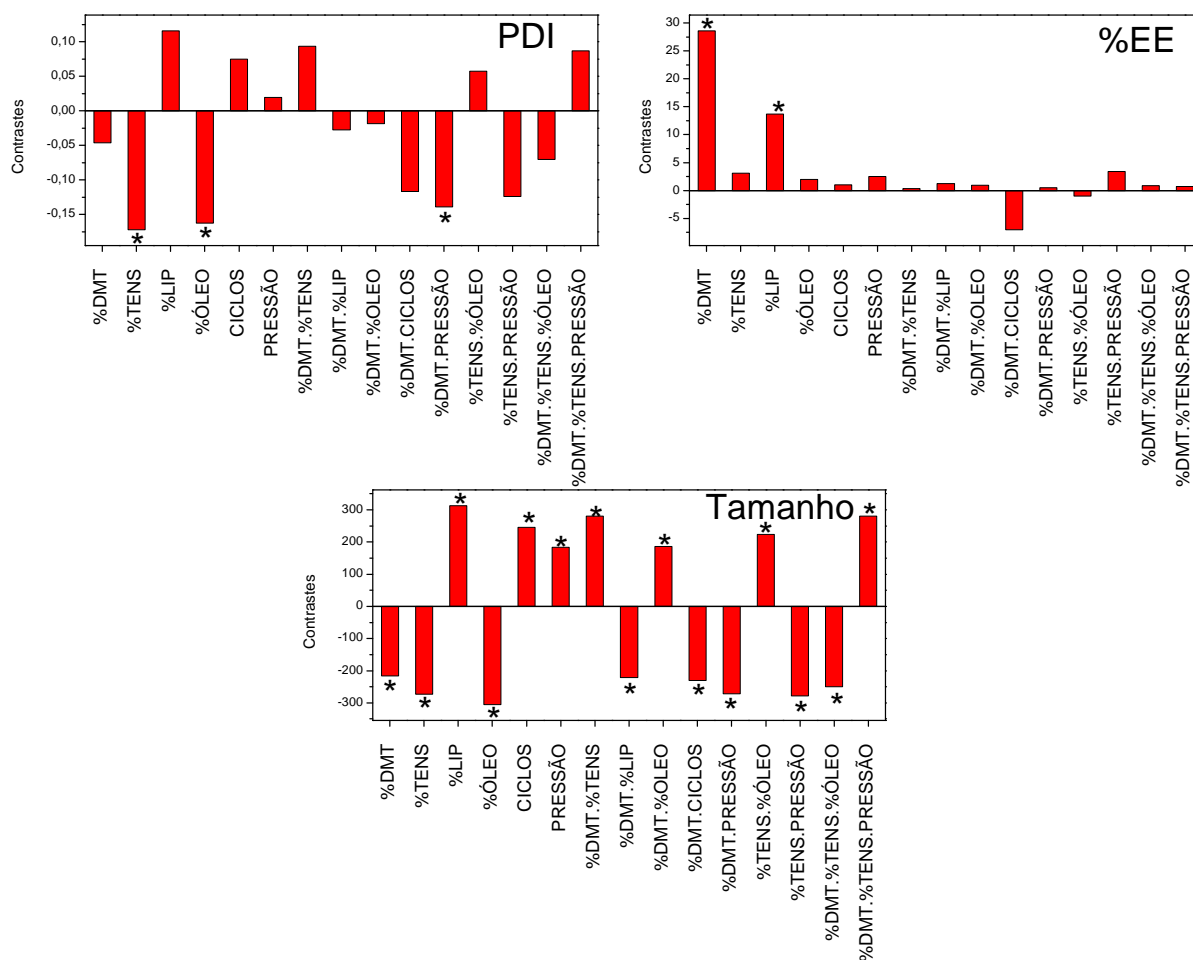
Nota: Se $p < 0,05$, o efeito é significativo

da viscosidade da formulação, provocados pelo aumento da concentração de %LIP (DAS et al., 2011).

Shah et al. (2014) realizaram um planejamento experimental do tipo Taguchi para avaliar a influência da concentração de lipídios e tensoativos no tamanho e estabilidade de NLS, constituídas do lipídio ácido esteárico e tensoativo Tween[®] 20, preparadas através da metodologia de microemulsão. Os autores verificaram que o aumento da concentração de lipídio provocou aumento no tamanho médio das NLS obtidas e atribuíram este efeito ao aumento da viscosidade da formulação ao se aumentar concentração de lipídios.

O mesmo argumento que relaciona o aumento da concentração de lipídio ao aumento da viscosidade e, conseqüentemente, aumento do tamanho médio das nanopartículas obtidas foi utilizado por Fangueiro et al. (2012) em estudo que realizou um planejamento fatorial 3^3 para preparação de NLS, através da metodologia de emulsões múltiplas, constituídas do lipídio Dynasan[®] 114 e os tensoativos fosfatidilcolina de soja e Tween[®] 80. Os autores afirmaram também que o aumento da viscosidade promoveu o aumento da tensão superficial,

Figura 41 – Contrastes dos fatores e interações obtidas para as respostas: tamanho, PDI e %EE.



Fonte: produzido pelo autor.

Nota: * Contrastes considerados estatisticamente significativos $p < 0,05$

influenciando no aumento do tamanho médio das nanopartículas obtidas.

Pathak e Nagarsenker (2009) desenvolveram NLS, através da metodologia de emulsificação-ultrassom, com composição lipídica de Compritol[®] 888 ATO e Precirol[®] ATO 5 e CLN a partir dos lipídios Compritol[®] 888 ATO (sólido) e Miglyol[®] 810 (líquido) contendo o anestésico lidocaína e verificaram também que o aumento da concentração de lipídios estava relacionado com o aumento do tamanho médio das nanopartículas obtidas. A razão para este aumento, segundo os autores, também foi o aumento da viscosidade da formulação provocada pelo aumento da concentração de lipídios.

É importante ressaltar o estudo realizado por Stang, Schuchmann e Schubert (2001), que avaliaram a preparação de emulsões O/A através da metodologia de HAP e o possível efeito do aumento da concentração de fase oleosa na diminuição do tamanho das gotículas. Os autores relataram que o incremento de óleo (fase interna) na formulação não alterou o tamanho da gotícula de fase interna obtida em processo de HAP sob pressão de 100 bar,

que corresponde a 10^7 J/m^3 .

Baseado nos resultados apresentados por Stang, Schuchmann e Schubert (2001), não é possível afirmar que a mudança na viscosidade da formulação de CLN de cera de carnaúba e óleo de pracaxi, provocada pelo aumento do fator %LIP, seja a responsável pelo aumento do tamanho médio dos CLN obtidos, pois as pressões utilizadas neste fatorial fracionado foram de 300 bar a 900 bar. Entretanto, o incremento de %LIP na formulação pode ter aumentado a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa, provocando assim, o aumento do tamanho médio das partículas de CLN.

Nos resultados apresentados pela Figura 41 e Tabela 31 pode-se observar que o tamanho médio do CLN diminui se os níveis dos fatores %DXM, %TENS e %OLEO aumentarem. O aumento da concentração de tensoativo (%TENS) está relacionado à diminuição da tensão interfacial da dispersão e maior facilidade de diminuição do tamanho das gotículas de fase interna durante a preparação do CLN (DAS et al., 2011).

O aumento da concentração de óleo de pracaxi na mistura lipídica (%OLEO) e a diminuição do tamanho médio do CLN está relacionada, provavelmente, à diminuição da temperatura de fusão da mistura lipídica promovida pela maior concentração de óleo de pracaxi. Segundo Mäder, Mehnert e Mäder (2001) o tamanho médio de dispersões de NLS, preparadas pela metodologia de HAP, aumenta conforme o aumento do ponto de fusão do lipídio utilizado. Sendo assim, conforme exposto na subseção 4.3.2.1, as misturas lipídicas compostas por cera de carnaúba e óleo de pracaxi apresentaram ponto de fusão em temperaturas menores de acordo com o incremento da proporção de óleo na mistura cera:óleo.

Outro argumento para explicar esta relação entre o aumento do nível do fator %LEO e a diminuição do tamanho médio do CLN é a possibilidade da maior concentração de lipídio líquido na mistura lipídica promover menor viscosidade da fase oleosa, pois a proporção de óleo (menor viscosidade) será maior que da cera de carnaúba (maior viscosidade). A viscosidade menor pode melhorar a eficiência da dispersão da fase oleosa durante as etapas de pré-emulsão e homogeneização à alta pressão. Além disto, a alta temperatura (90°C) empregada no processo de preparação do CLN diminui consideravelmente a viscosidade do óleo de pracaxi, de acordo com os resultados apresentados na subseção 5.1.2.

Continuando a análise do gráfico da resposta tamanho exposto na Figura 41 e os dados da Tabela 31, verificou-se que os fatores *CICLOS* e *PRESSO* apresentaram efeito positivo sobre a resposta tamanho, ou seja, o aumento da pressão e dos ciclos de homogeneização promoveram aumento do tamanho médio dos CLN. Este evento está relacionado com a cinética de adsorção do tensoativo nas gotículas de fase interna recém formadas através das forças de cisalhamento empregadas na metodologia de preparação.

Quanto maior a energia entregue à dispersão, devido o aumento da pressão e ciclos de homogeneização, mais eficiente será a ruptura e, conseqüentemente, a formação de gotículas de fase interna menores. Se o tensoativo hidrofílico utilizado não apresentar

cinética de adsorção rápida o suficiente para estabilizar as novas gotículas de fase interna criadas, poderá haver coalescência das mesmas e, inevitavelmente, aumento de tamanho. Foi observado que os fatores pressão e ciclos foram significativos apenas para a resposta tamanho, no entanto, a interpretação desta resposta foi prejudicada pois todos os fatores avaliados se mostraram significativos também (GRAMDORF et al., 2008; STANG; SCHUCHMANN; SCHUBERT, 2001).

Analisando o gráfico da resposta de índice de polidispersão (PDI) na Figura 41 e os dados da Tabela 32, observou-se que os fatores *CICLOS* e *PRESSAO* também se mostraram positivos, ou seja, aumentaram o valor de PDI, entretanto, não foram significativos. Os resultados de PDI obtidos na maioria dos experimentos do fatorial fracionado se encontraram abaixo de 0,4 e podem ser considerados como satisfatórios para a estabilidade de dispersões de CLN. Além disto, o efeito positivo dos fatores *CICLOS* e *PRESSAO* sobre a resposta PDI, estatisticamente não significativo, sugere que a concentração (2% a 5%) e tipo de tensoativos (não-iônico - Tween 80[®] e Span60[®]) utilizados apresentaram cinética de adsorção interfacial adequada para estabilizar as gotículas de fase interna formadas durante a preparação dos CLN.

O PDI dos CLN obtidos no fatorial fracionado se encontraram no intervalo entre 0,141 (formulação 4, Tabela 30) e 1 (formulação 7, instável - separação de fases), Tabela 30). Os fatores principais significativos para a resposta PDI foram %*TENS* e %*OLEO*, apresentando efeito negativo, ou seja, o aumento da concentração dos fatores %*TENS* e %*OLEO* promovem a diminuição da resposta PDI. A interação de segunda ordem (%*DXM* × *PRESSAO*) ou o padrão de confundimento (%*OLEO* × *CICLOS*) apresentou também efeito negativo sobre a resposta PDI. Os demais fatores não apresentaram efeito significativo. Diferentemente do que foi observado na análise da resposta tamanho, os contrastes de terceira ordem não apresentaram efeito significativo, possibilitando assim, maior segurança para determinar que os fatores principais %*TENS* e %*OLEO* foram significativos para diminuição da resposta PDI.

O PDI é uma medida de dispersão que mostra a amplitude de distribuição de tamanho das nanopartículas. Quanto menor o valor de PDI, mais estreita é a dispersão de tamanho e maior a estabilidade das nanopartículas, pois partículas com tamanho uniforme têm menor tendência de aglomeração. Valores menores que 0,3 indicam distribuição uniforme de tamanho das partículas e menor chance de aglomeração de partículas por meio de coalescência. Sendo assim, o menor PDI obtido (0,141, formulação 4 da Tabela 30) é indicativo de boa estabilidade dos CLN obtidos. Entretanto, o maior PDI obtido (1, formulação 7 da Tabela 30) indica instabilidade evidenciada por separação de fases.

O fator %*TENS* foi relacionado à diminuição de PDI provavelmente pelo fato da concentração de tensoativo ter um papel importante em evitar a coalescência por meio de impedimento estérico (IVANOV; DANOV; KRALCHEVSKY, 1999). Observou-se também que %*TENS* é um fator significativo para a diminuição da resposta tamanho, pois diminui

Tabela 32 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta PDI.

fator	Confundimento	Contraste	p
Efeitos principais			
A	%DXM	BCE DEF	-0,046625 0,280594
B	%TENS	ACE CDF	-0,172125 0,032540
C	%LIP	ABE BDF	0,115625 0,068135
D	%ÓLEO	AEF BCF	-0,162625 0,036243
E	CICLOS	ABC ADF	0,074625 0,143733
F	PRESSÃO	ADE BCD	0,019125 0,608982
Interações			
AB		CE	0,093375 0,099218
AC		BE	-0,027375 0,480419
AD		EF	-0,018625 0,617693
AE		BC DF	-0,116875 0,066828
AF		DE	-0,139375 0,048405
BD		CF	0,057375 0,213258
BF		CD	-0,123875 0,060136
ABD		ACF BEF CDE	-0,070125 0,158474
ABF		ACD BDE CEF	0,087125 0,111583

Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: Se $p < 0,05$, o efeito é significativo

a tensão interfacial, sendo assim %TENS é relevante na diminuição do tamanho e na manutenção da estabilidade do sistema disperso (PEZESHKI et al., 2014; SHAH et al., 2014).

A eficiência de incorporação de DXM (%EE) pelos CLN variou entre 0 % (formulação 8, Tabela 30) e 50,63 % (formulação 19, Tabela 30). A análise estatística das respostas de %EE, apresentada na Tabela 33, mostrou que os fatores que influenciaram significativamente a eficiência de incorporação de DXM foram %DXM e %LIP, ou seja, o aumento da concentração de %DXM e %LIP promoveram o aumento da eficiência de incorporação de DXM. Observou-se também que apenas parâmetros de composição promoveram aumento da quantidade de fármaco (DXM) incorporada nos CLN.

O fato de %DXM apresentar efeito significativo na eficiência de incorporação de DXM pelos CLN mostra que a matriz lipídica dos CLN não alcançou a concentração de saturação de DXM. Acredita-se que não se obteve maior eficiência de incorporação devido a partição da dexametasona entre fase aquosa e oleosa. A fase aquosa contendo tensoativo

Tabela 33 – Fatores, padrões de confundimento, contrastes e valores de p da análise estatística (ANOVA) da resposta %EE.

fator	Confundimento	Contraste	p	
Efeitos principais				
A	%DXM	BCE DEF	28,58250	0,007413
B	%TENS	ACE CDF	3,11500	0,335151
C	%LIP	ABE BDF	13,65500	0,031311
D	%ÓLEO	AEF BCF	1,99500	0,504776
E	CICLOS	ABC ADF	1,03250	0,717040
F	PRESSÃO	ADE BCD	2,51000	0,417203
Interações				
AB		CE	0,34500	0,901898
AC		BE	1,21500	0,672039
AD		EF	0,91000	0,748353
AE		BC DF	-7,02250	0,104990
AF		DE	0,48500	0,862732
BD		CF	-1,00250	0,724630
BF		CD	3,39250	0,303986
ABD		ACF BEF CDE	0,83750	0,767271
ABF		ACD BDE CEF	0,74250	0,792464

Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: Se $p < 0,05$, o efeito é significativo

e as altas temperaturas de preparação dos CLN podem ter provocado o deslocamento da DXM para a fase aquosa (RAVI et al., 2014; RAHMAN et al., 2010; FRIEDRICH; FONTANA; BECK, 2008). O segundo fator com efeito significativo no aumento da resposta %EE foi %LIP, deste modo, aumentando-se a concentração de %LIP na formulação a %EE de DXM será maior. Este efeito é possivelmente atribuído ao aumento da viscosidade do meio, que facilita a rápida solidificação e cristalização da matriz lipídica, promovendo maior aprisionamento de DXM no CLN e também a menor partição da DXM para o meio aquoso (fase dispersante) (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001; RAHMAN et al., 2010).

5.6.3 Planejamento composto central

Os fatores selecionados, a partir dos resultados obtidos do fatorial fracionado, para serem utilizados no planejamento composto central foram %LIP e %TENS.

O fator %LIP foi selecionado porque apresentou efeito positivo significativo para a resposta %EE, indicando que o aumento da concentração deste fator pode promover

maior eficiência de incorporação de DXM.

O fator %TENS foi escolhido devido o efeito negativo significativo apresentado para a resposta PDI, mostrando que o aumento da concentração de tensoativos na formulação pode promover menor PDI e, conseqüentemente, auxiliar na estabilidade da formulação.

Os níveis do fator %LIP foram determinados no intervalo entre 8,96 % (nível mínimo) e 16,04 % (nível máximo). Optou-se por manter o nível máximo utilizado em (16,04 %) devido a limitações técnicas do equipamento utilizado e o fato da cera de carnaúba apresentar difícil manuseio durante a etapa de HAP, pois pequenas variações de temperatura durante os ciclos de homogeneização promoviam a solidificação do lipídio e a interrupção do processo de preparação.

Os níveis utilizados para o fator %TENS compreenderam o intervalo entre 1,38 % (nível mínimo) e 5,62 % (nível máximo). Adotou-se a concentração máxima de tensoativos (Tween[®] 80 e Span[®] 60) em 5 %, apesar do resultado obtido no fatorial fracionado indicar que concentrações maiores de tensoativos produziram CLN com PDI menor, pois altas concentrações de tensoativo poderiam provocar efeitos indesejáveis durante a aplicação tópica, como por exemplo, irritação da pele (EFFENDY; MAIBACH, 1995a; BÁRÁNY; LINDBERG; LODÉN, 2000).

Os demais fatores que constituíram o fatorial fracionado receberam níveis fixos nas formulações preparadas a partir da matriz de experimentos do planejamento composto central.

Os fatores CICLOS e PRESSÃO apresentaram efeito positivo significativo apenas para a resposta tamanho no planejamento fatorial fracionado (Figura 41) e o aumento dos seus respectivos níveis possivelmente aumentará o tamanho médio dos CLN, pois o aumento da quantidade de ciclos e o uso de maiores pressões de homogeneização provocam a coalescência das gotículas de fase interna devido ao incremento de energia cinética da formulação (ARAÚJO et al., 2010; MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001). Por isso, o fator CICLOS foi fixado no nível mínimo (1 ciclo) e o fator PRESSÃO no nível intermediário (600 bar).

O fator %OLEO foi mantido em seu nível máximo, pois segundo os resultados obtidos no fatorial fracionado para a resposta PDI, o aumento da concentração de óleo na mistura lipídica pode, eventualmente, diminuir o PDI. Valores de PDI entre 0,1 e 0,3 indicam boa estabilidade das nanopartículas e, além disto, o aumento da proporção de lipídio líquido na mistura lipídica promove a diminuição da cristalinidade das cadeias da mistura lipídica, conforme apresentado na seção 5.2.

O fator %DXM foi selecionado no nível intermediário (0,15 % (p/p)), mesmo apresentando efeito positivo para a resposta %EE, porque os resultados de eficiência de incorporação situaram-se abaixo de 50,63 % no planejamento fatorial fracionado (Tabela 30) e, por isso, o nível intermediário se mostrou razoável para que a formulação final não apresentasse grande quantidade de DXM não incorporada no CLN e, possivelmente, em

forma de cristais na superfície dos CLN ou na fase aquosa.

A matriz do planejamento composto central foi constituída por um total de 11 experimentos, compreendendo 4 pontos fatoriais, 4 axiais e 3 repetições do ponto central. As formulações preparadas no planejamento experimental proposto e os resultados referentes às respostas avaliadas estão apresentadas na Tabela 34.

Tabela 34 – Formulações de CLN de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo DXM obtidas a partir do planejamento composto central.

Formulação	Fatores e níveis		Respostas				
	%LIP	%(p/p)	%TENS	%(p/p)	Tamanho (nm)	PDI	%EE (%)
1	0		1,41		194,2	0,265	53,6
2	0		0		226,1	0,276	49,1
3	1		1		195,2	0,159	48,5
4	-1		-1		221	0,180	54,3
5	-1,41		0		185,5	0,181	55,9
6	0		0		219,5	0,280	49,8
7	1,41		0		209,1	0,216	53,4
8	1		-1		261,7	0,298	64,0
9	-1		1		173,2	0,166	49,3
10	0		-1,41		301,2	0,320	60,5
11	0		0		214,3	0,185	54,7

Fonte: Produzido pelo autor.

O PDI dos CLN obtidos nas formulações do planejamento composto central variou entre 0,159 (formulação 3, Tabela 34) e 0,320 (formulação 10, Tabela 34), enquanto que a resposta %EE variou entre 48,53% (formulação 3, Tabela 34) e 64,05% (formulação 8, Tabela 34). A análise estatística das respostas obtidas para PDI e %EE mostrou que nenhum dos fatores, entre os níveis avaliados, apresentou efeito significativo.

O tamanho das partículas variou entre 173,26 nm (formulação 9, Tabela 34) e 301,2 nm (formulação 10, Tabela 34). A Tabela 35 apresenta os efeitos estimados, com 95% de nível de confiança, obtidos para a resposta tamanho. Valores de p menor que 0,05 significam que o fator avaliado foi significativo.

O modelo quadrático sugerido encontra-se ajustado aos dados experimentais ($p < 0,05$) e com bom coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9590$). Os resíduos se apresentaram aleatoriamente distribuídos, que sugere ausência de erros sistemáticos. O *lack of fit* não foi significativo ($p > 0,05$), indicando que dos dados podem ser descritos pelo modelo.

Observou-se que a interação linear (%LIP.%TENS) não foi significativa ($p > 0,05$). Por isso, a mesma foi ignorada para construção do modelo quadrático proposto para a resposta tamanho.

Tabela 35 – Efeitos estimados da resposta tamanho do planejamento composto central.

	Fator	Contraste	<i>p</i>
A	%LIP (linear)	24,0808	0,028915
A	%LIP (quadrático)	-27,7333	0,030944
B	%TENS (linear)	-66,4584	0,003944
B	%TENS (quadrático)	22,9684	0,044187

Fonte: Produzido pelo autor.

A equação polinomial de segunda ordem com fatores codificados pode ser observada na Equação 5.5, onde a variável x corresponde ao fator %LIP e y ao fator %TENS.

Nesta equação pode-se identificar os fatores que mais influenciaram a resposta tamanho comparando os coeficientes. Quanto maior (em valores absolutos) o coeficiente, maior o efeito na resposta. Coeficientes positivos indicam aumento na resposta e coeficientes negativos, o inverso.

$$D_{nm} = 220,02 + 12,04x - 13,86x^2 - 33,22y + 11,48y^2 \quad (5.5)$$

A Figura 42 e Figura 43 também apresentam os gráficos de superfície da resposta tamanho em função dos fatores %LIP (x) e %TENS (y), como também os níveis onde poderão ser obtidos o menor tamanho médio de CLN.

A resposta tamanho de partícula apresentou duas regiões no gráfico de superfície de resposta onde se pode obter menor tamanho, correspondendo às formulações 5 e 9 da Tabela 34. Pode-se observar que diminuindo a concentração total de lipídios na formulação e aumentando a concentração de tensoativos obtém-se CLN de menor tamanho médio.

O aumento de %TENS diminui a tensão interfacial, facilitando a miscibilidade das fases aquosa e oleosa durante o processo de pré-emulsificação e homogeneização a alta pressão, o que explica o menor tamanho de CLN obtido (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

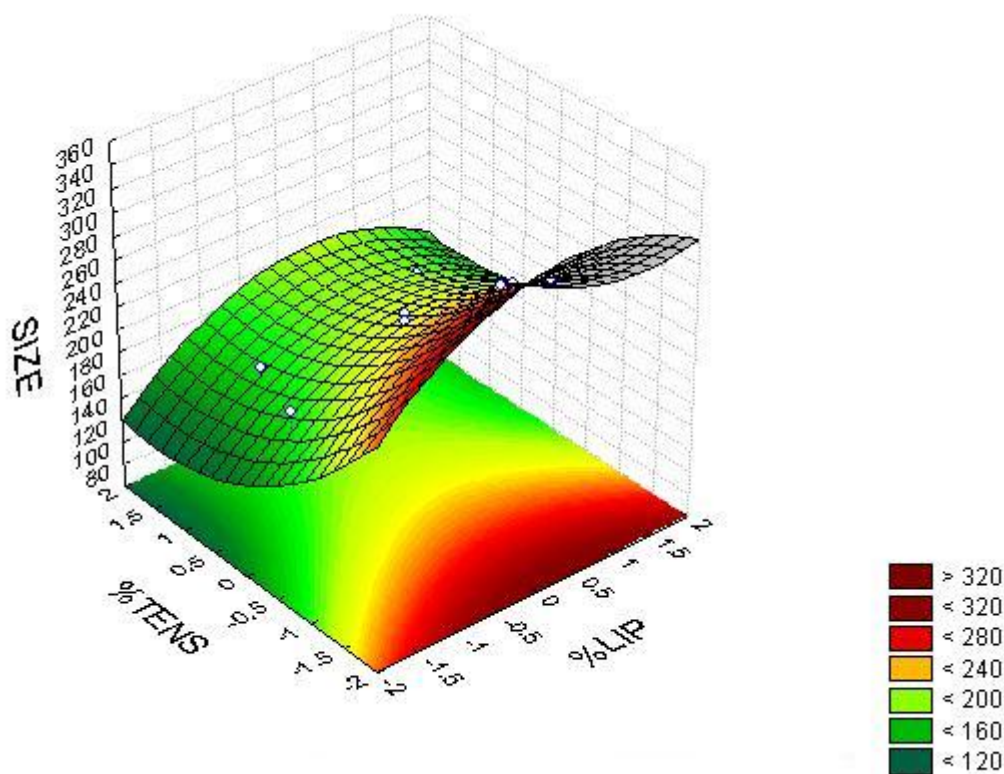
A técnica de homogeneização a alta pressão comparada com outras técnicas de cisalhamento como, por exemplo, Ultraturrax[®] e ultrassom, é a que fornece maior energia ao sistema, provocando o cisalhamento das partículas de forma mais eficiente.

A energia alcançada pela HAP pode alcançar valores em torno de 1000 W/m³. Além da grande quantidade de energia empregada, a mesma é distribuída uniformemente na amostra (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Ao se diminuir %LIP na formulação, haverá mais energia disponível por m³ de fase interna para promover cisalhamento, resultando em menor tamanho de partícula.

Segundo os gráficos de superfície de resposta (Figura 42 e Figura 43), os níveis dos fatores ainda não alcançaram o ponto de resposta mínima (menor tamanho), indicando

Figura 42 – Representação gráfica em 3D (superfície de resposta) do modelo quadrático proposto para resposta tamanho.



Fonte: produzido pelo autor.

que podem-se obter tamanhos menores diminuindo os níveis de %LIP e aumentando o nível de %TENS.

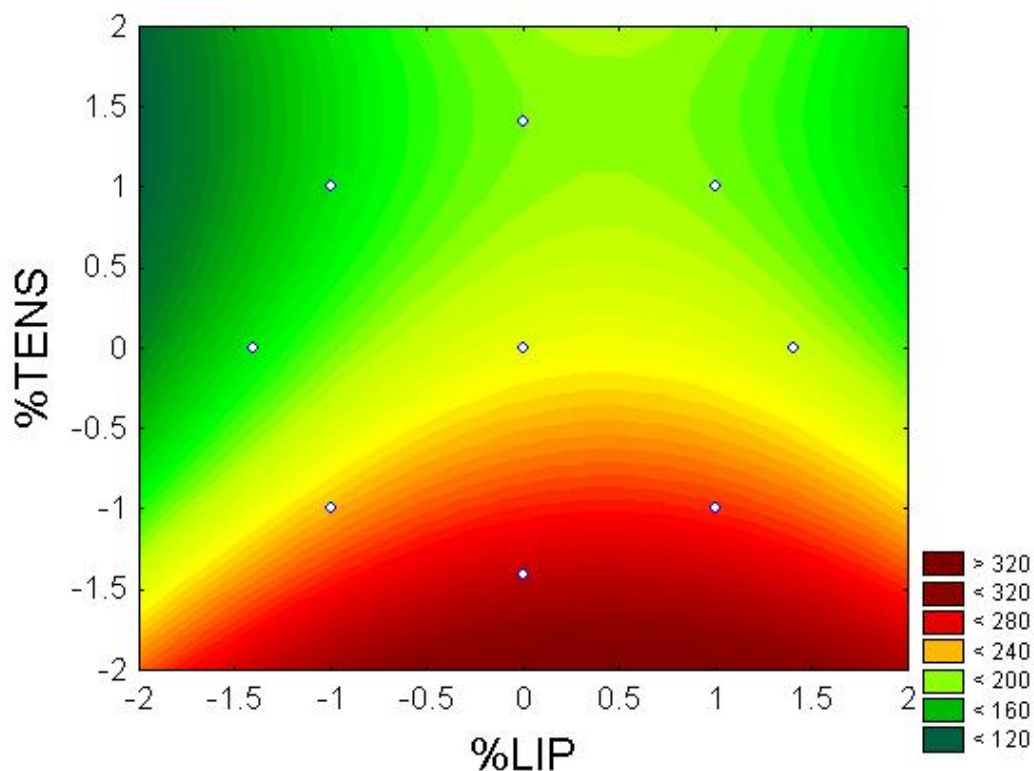
Estas mudanças nos níveis dos fatores %LIP e %TENS não são desejados pois altas concentrações de tensoativos provocariam o aumento no risco de efeitos indesejáveis, como por exemplo, irritação da pele (LEE et al., 2000; EFFENDY; MAIBACH, 1995b), e ao mesmo tempo, diminuir a concentração de lipídios poderia ocasionar a diminuição da quantidade total de fármaco incorporado no CLN da formulação.

Avaliando os gráficos de superfície de resposta do planejamento composto central (Figura 42 e Figura 43), as formulações com menor tamanho médio de CLN obtido foram a de número 5 (185 nm) e 9 (173 nm) da Tabela 34.

Entre as duas formulações optou-se por escolher a formulação com menor tamanho médio de partícula e maior concentração de lipídios e tensoativos (formulação 9), tendo em vista a hipótese de obter uma formulação com maior eficiência na penetração da DXM nas camadas da pele após a aplicação tópica.

Por conta disto, a formulação selecionada para dar prosseguimento nos experimentos *in vitro* de avaliação da cinética de liberação e penetração/permeação em pele de orelha

Figura 43 – Representação gráfica em 2D do modelo quadrático proposto para resposta tamanho.



Fonte: produzido pelo autor.

de porco da DXM apresentou os seguintes fatores e níveis: %DXM 0,15 % (p/p), %LIP 10 % (p/p), %LEO 40 % (p/p), %TENS 5 % (p/p), CICLOS 1 e PRESSÃO 600 bar.

A formulação selecionada (CLN-DXM) está descrita na Tabela 36.

Tabela 36 – Formulação CLN-DXM selecionada no CCD.

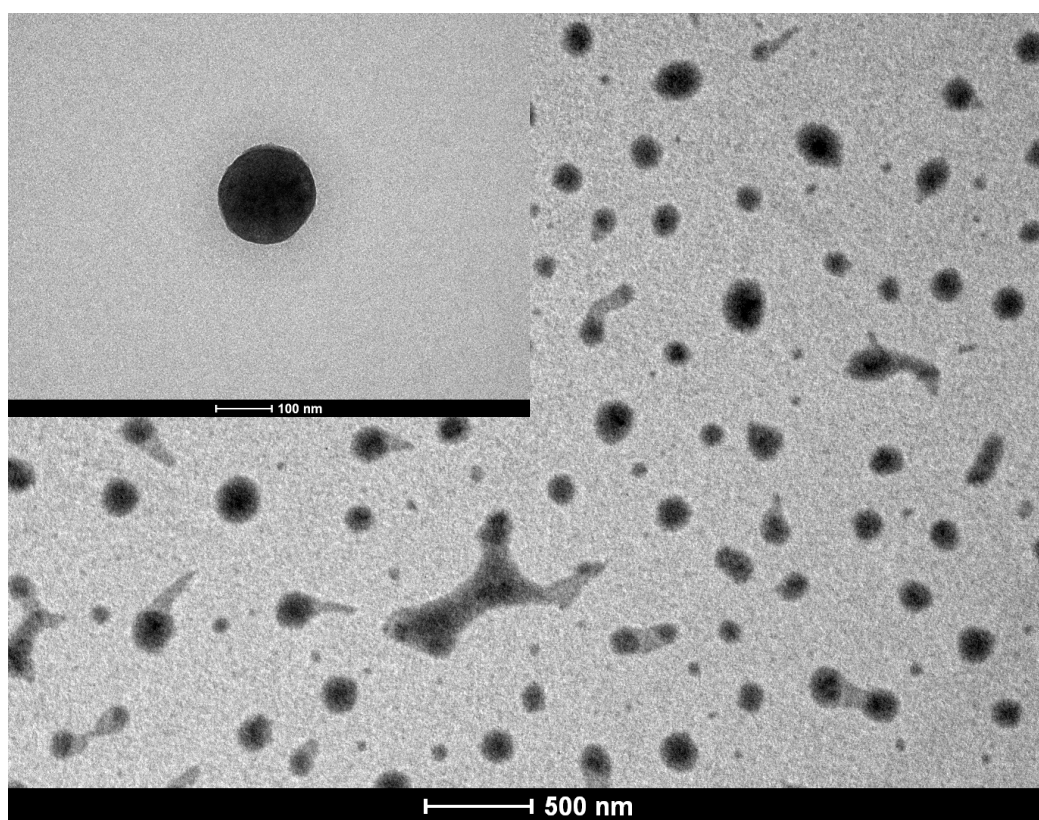
Fator	Quantidade
Dexametasona (%DXM)	0,15 % (p/p)
Concentração total de lipídios (%LIP)	10 % (p/p)
Proporção de óleo na mistura lipídica (%ÓLEO)	40 % (p/p)
Concentração de tensoativos (%TENS)	5 % (p/p)
Ciclos de homogeneização (CICLOS)	1
Pressão de homogeneização (PRESSÃO)	600 bar

Fonte: Produzido pelo autor.

5.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Os CLN da formulação selecionada a partir do planejamento fatorial de composição central apresentou forma esférica, tamanho uniforme e população homogeneamente distribuída. A Figura 44 apresenta duas imagens em escalas de 100 e 500 nm. O tamanho obtido por MET foi ligeiramente menor que os obtidos por *dynamic light scattering* (DLS), contudo, esta diferença é aceitável devido as diferenças nos fundamentos de cada técnica. Pode-se observar na nanopartícula em destaque da Figura 44, que o formato esférico é bem definido e sem irregularidades.

Figura 44 – Microscopia eletrônica de transmissão do CLN



Fonte: produzido pelo autor.

5.7 Liberação *in vitro* da DXM

As condições do ensaio de liberação *in vitro* da DXM foram estabelecidas com o objetivo de manter a condição *sink* durante todo o experimento.

Decidiu-se utilizar tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 acrescido de 0,02% (m/v) de Tween[®] 80 como meio receptor, com o objetivo de aumentar a solubilidade da DXM e, com isso, ter maior segurança de que a condição *sink* seria mantida. Beber et al. (2016)

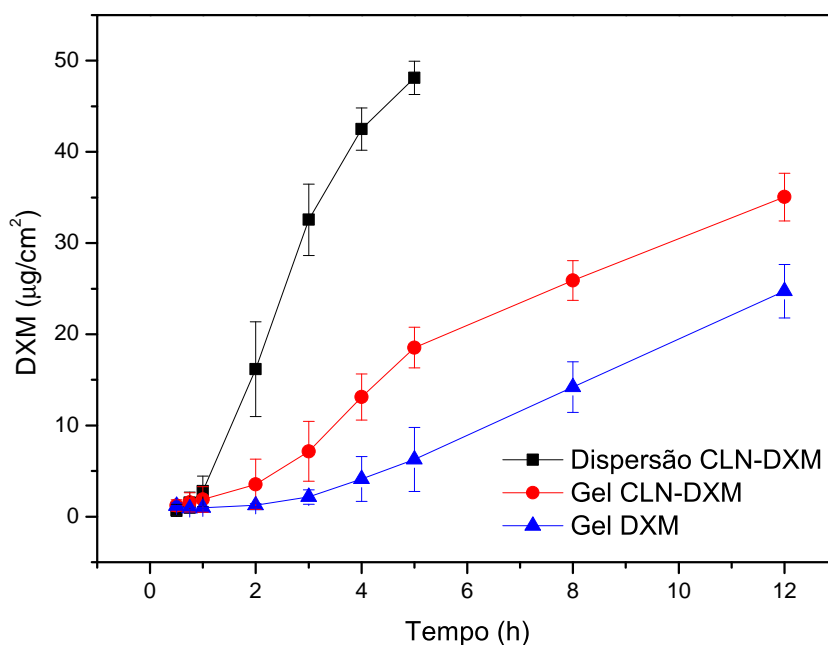
determinaram a solubilidade da DXM em tampão fosfato pH 7,4 acrescido de Tween[®] 80 0,02% (m/v) em 78,93 µg/mL a 25°C.

A coleta de 2 mL de meio receptor (1 mL de *rinse* e 1 mL de amostra), nos tempos predeterminados, foi suficiente para garantir a manutenção da concentração de DXM abaixo de 10% da saturação do meio receptor e manter a condição *sink* durante todo o experimento.

A Figura 45 apresenta o perfil de liberação *in vitro* da DXM a partir de gel de DXM livre (Gel DXM), gel de DXM incorporada em CLN (Gel CLN-DXM) e dispersão aquosa de CLN contendo DXM incorporada (CLN-DXM).

A situação hipotética de liberação da quantidade total de DXM contida no meio doador (100 µg) corresponde à permeação de 53,76 µg/cm² de DXM através da membrana de acetato de celulose que dividiu os compartimentos doador e receptor da célula de Franz.

Figura 45 – Perfil de liberação *in vitro* da DXM.



Fonte: produzido pelo autor.

Pode-se observar para a formulação CLN-DXM que nas primeiras 3 horas houve liberação de 32,61 µg/cm² de DXM, que corresponde a aproximadamente 60% da concentração de fármaco adicionado no início do experimento. O restante foi liberado por um período de até 12 horas.

A formulação Gel CLN-DXM apresentou um perfil de liberação lenta e sem a ocorrência de liberação rápida inicial (*burst effect*). A utilização do gel de Carbopol[®] como excipiente para formulação provocou diminuição estatisticamente significativa da velocidade de liberação da DXM em comparação à formulação CLN-DXM. Pode ser verificado na Figura 45 que a liberação de 32,61 µg/cm², observada nas três primeiras

horas de experimento da formulação CLN-DXM, foi diminuída para $7,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na formulação Gel CLN-DXM, que corresponde a uma redução de 4,5 vezes.

A formulação Gel DXM apresentou, de forma semelhante à formulação Gel CLN-DXM, perfil de liberação lento e sem a ocorrência do *burst effect*, no entanto, constatou-se que a liberação da DXM foi mais lenta que nas demais formulações avaliadas. A formulação Gel DXM apresentou a liberação de $27,89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DXM após 12 horas de experimento, que corresponde à 51,87% da quantidade teórica de DXM adicionada no compartimento doador da célula de Franz.

A Tabela 37 apresenta a significância estatística (valor de p) da análise de variância ANOVA seguida pelo exame das diferenças entre as médias (teste t) efetuada sobre a quantidade acumulada de DXM liberada em cada tempo de coleta ($n=4$) das diferentes formulações avaliadas (Gel DXM, Gel CLN-DXM e CLN-DXM).

Durante os dois tempos iniciais de liberação de DXM (0,5 e 1h) não houveram diferenças significativas entre as formulações. Entretanto, a partir de 2 horas de liberação houveram diferenças significativas entre as formulações (Gel DXM e CLN-DXM) e (Gel CLN-DXM e CLN-DXM). Nos tempos seguintes, todas as formulações apresentaram diferença significativa entre si no que diz respeito à quantidade acumulada de DXM liberada nos tempos de coleta predeterminados.

Tabela 37 – Diferença estatística da liberação de DXM entre as formulações avaliadas.

Grupos	Significância estatística		
	2h	3h	4 - 12h
Gel DXM e Gel CLN-DXM	não significativo	$p < 0,05$	$p < 0,001$
Gel DXM e CLN-DXM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gel CLN-DXM e CLN-DXM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Fonte: Produzido pelo autor.

As formulações Gel DXM e CLN-DXM apresentaram perfil cinético melhor ajustado por modelo linear, que descreve a liberação como independente da concentração de fármaco (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). Entretanto, a formulação Gel CLN-DXM apresentou perfil cinético melhor ajustado ao modelo de Higuchi. Os coeficientes de determinação (r^2) dos modelos de liberação avaliados podem ser visualizados na Tabela 38.

A tabela Tabela 39 apresenta a constante de liberação k , expressa em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, e o atraso na liberação (*lag time*) t_{Lag} , em horas, para as formulações Gel DXM e CLN-DXM, calculados a partir da inclinação da reta de regressão linear e o intercepto no eixo x do modelo linear, respectivamente (JANTHARAPRAPAP; STAGNI, 2007).

A tabela Tabela 40 apresenta a inclinação da curva, expressa em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$, e o atraso na liberação (*lag time*) t_{Lag} , em horas, para a formulação Gel CLN-DXM, calculados a partir da inclinação da reta de regressão linear e o intercepto no eixo x do modelo de

Tabela 38 – Liberação da DXM ajustada por regressão linear segundo os modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

Formulação	Correlação ao modelo (r^2)		
	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi
CLN-DXM ($t_{1h} \rightarrow t_{5h}$)	0,9823	0,8514	0,9775
Gel CLN-DXM ($t_{2h} \rightarrow t_{12h}$)	0,9623	0,7793	0,9903
Gel DXM ($t_{2h} \rightarrow t_{12h}$)	0,9915	0,9173	0,9561

Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 39 – Equações, constantes de liberação k e atrasos na liberação t_{Lag} das formulações avaliadas (n=4).

Formulação	Equação	k ($(\mu\text{g}/\text{cm}^2)/\text{h}$)	t_{Lag} (h)
CLN-DXM ($t_{1h} \rightarrow t_{5h}$)	$y = 11,596x - 6,2988$	$11,596 \pm 0,4904$	$0,5445 \pm 0,1583$
Gel DXM ($t_{2h} \rightarrow t_{12h}$)	$y = 2,4279x - 4,9673$	$2,4279 \pm 0,2590$	$2,0515 \pm 0,6023$

Fonte: Produzido pelo autor.

Higuchi, respectivamente.

Tabela 40 – Equação do modelo de higuchi.

Formulação	Equação	k ($(\mu\text{g}/\text{cm}^2)/\text{h}^{0,5}$)	t_{Lag} (h)
Gel CLN-DXM ($t_{2h} \rightarrow t_{12h}$)	$y = 15,64x - 18,432$	$15,9768 \pm 0,1805$	$1,1749 \pm 0,2694$

Fonte: Produzido pelo autor.

Em nanopartículas lipídicas (NLS e CLN), o fármaco pode está incorporado na matriz lipídica de duas formas: dissolvido ou disperso na matriz. A afinidade do mesmo pelos constituintes da matriz lipídica é uma das propriedades que definem de que forma ocorrerá a incorporação.

O fármaco dissolvido na matriz lipídica resulta em um perfil de liberação mais lento em comparação à forma dispersa (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; VAGHASIYA; KUMAR; SAWANT, 2013; UNER; YENER, 2007).

De acordo com o perfil de liberação apresentado pelas formulações avaliadas, provavelmente, a DXM está dispersa na matriz lipídica do CLN.

Condições experimentais, como a temperatura, por exemplo, podem afetar o perfil de liberação de fármacos incorporados em CLN. Durante o período de avaliação da liberação da DXM pode ter havido perda de água por evaporação da formulação CLN-DXM e, com isso, a ocorrência de transições polimórficas na matriz lipídica do CLN, que tornam gradativamente a dispersão mais espessa e gelificada.

Além das mudanças no aspecto da dispersão, as transições polimórficas na matriz lipídica aceleram a expulsão do fármaco aprisionado no CLN e, com isso, aumentam a

velocidade de liberação (JENNING; SCHÄFER-KORTING; GOHLA, 2000).

A transição polimórfica, provocada pela perda de água, foi reduzida quando a dispersão de CLN foi incorporada no gel de Carbol[®] (Gel CLN-DXM). Consequentemente, a liberação de DXM na formulação Gel CLN-DXM tornou-se mais lenta, apresentando o perfil de liberação visualizado na Figura 45. Além disto, a rede polimérica que forma o hidrogel também exerce influência no perfil de liberação, pois aumenta a resistência à difusão do fármaco (TAS et al., 2003).

A partição da molécula de DXM entre o veículo e o meio receptor também pode ser elencada como um dos possíveis fatores responsáveis pelo perfil de liberação obtido. A liberação da DXM está relacionada com a estrutura do CLN, bem como a interação da mesma com os constituintes do carreador (ZHAI; ZHAI, 2014; JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011).

O fato de ter havido liberação de DXM a partir do CLN (CLN-DXM) de forma mais rápida que da DXM livre incorporada no gel (Gel DXM) pode ser atribuída às interações fracas entre os constituintes do CLN e a DXM, provocando rápida difusão da DXM para o meio receptor.

A relativa baixa eficiência de incorporação de DXM nos CLN (49,30 %, Tabela 34), a solubilidade em água ultrapura de 68,62 µg/mL (seção 5.4) e o coeficiente de partição ($\log P$) óleo de pracaxi/DXM de -0,4250 (Tabela 28) avaliados neste trabalho são dados que sugerem a relativa baixa afinidade entre a DXM e os constituintes do CLN e a grande afinidade da DXM pela água em comparação ao óleo de pracaxi, que constitui 40 % da matriz lipídica do CLN.

Além dos dados obtidos neste trabalho, Einmahl et al. (1999) determinaram experimentalmente a solubilidade da DXM a 37 °C e obtiveram dissolução de 1 mg/mL em água. Essas evidências corroboram para a hipótese de que a interação entre a DXM e o CLN é fraca o suficiente para que haja a rápida difusão do fármaco para o meio receptor observada na Figura 45.

O raciocínio inverso é adequado para explicar a liberação lenta de DXM ocorrida na formulação Gel DXM em comparação às demais formulações avaliadas. A maior afinidade por água da DXM incorporada na rede polimérica hidrofílica do gel produz um ambiente de baixo gradiente de concentração em direção ao meio receptor que, juntamente com a viscosidade do gel, tornam a difusão mais lenta.

A liberação lenta de DXM incorporada em géis também foi observada em outros estudos. Borden et al. (2011) utilizaram gel de ácido hialurônico como veículo de DXM (fosfato dissódico) na concentração de 10 µg/mL e verificaram, após aplicação intratimpânica em porquinhos-da-índia (*guinea pig*), concentrações de DXM na perilinfa 72 horas após o tratamento.

Wang et al. (2009) utilizaram géis termo reversíveis de poloxamer 407 para promover liberação prolongada de DXM micronizada e obtiveram, em ensaios *in vivo*, concentrações

de DXM na perilíngua após 10 dias de tratamento. O grupo tratado com DXM (fosfato dissódico) em solução (2 %) apresentou concentração de DXM na perilíngua no máximo 12 horas após o tratamento.

Sütő et al. (2016) incorporaram o fármaco ibuprofeno (solubilidade de 3,44 mg/mL em água pH 7,4 à 37 °C (POTTHAST et al., 2005)) em CLN constituídos de Witepsol[®] E85 e Miglyol[®] 812 na proporção 7:3 com o intuito de promover permeação na pele deste fármaco. Os autores obtiveram perfil de liberação mais rápido do ibuprofeno incorporado em CLN em comparação ao ibuprofeno em suspensão (1 % em água) e também relacionaram este comportamento a interação fraca entre o fármaco e os constituintes do CLN.

Vivek, Reddy e Murthy (2007) avaliaram o coeficiente de partição da olanzapina entre diversos lipídios, utilizados comumente na preparação de CLN, e tampão fosfato pH 7,4 e verificaram que os CLN preparados com os lipídios que proporcionaram maior coeficiente de partição lipídio/tampão fosfato pH 7,4 da olanzapina foram os que apresentaram liberação do fármaco por mais tempo (liberação prolongada).

Venkateswarlu e Manjunath (2004), após avaliação do coeficiente de partição da clozapina em diversos lipídios e água e também o perfil de liberação a partir de NLS, concluíram que o coeficiente de partição de um fármaco entre o CLN, principalmente os constituintes lipídicos, e o meio receptor utilizado no ensaio de liberação *in vitro* é inversamente proporcional à velocidade de liberação do mesmo.

Em outro estudo, com o objetivo de avaliar a relação entre fármacos glicocorticóides (hidrocortisona base e as formas acetato, butirato, valerato e caprilato) com diferentes níveis de lipossolubilidade e o perfil de liberação *in vitro* obtido quando incorporados em NLS constituídos pelo lipídio Precirol[®] ATO 5, Jensen et al. (2010) verificaram que o aumento da lipossolubilidade e, conseqüentemente, a interação com a matriz lipídica, diminuiu a velocidade de liberação do fármaco a partir da NLS, produzindo perfis de liberação mais longos.

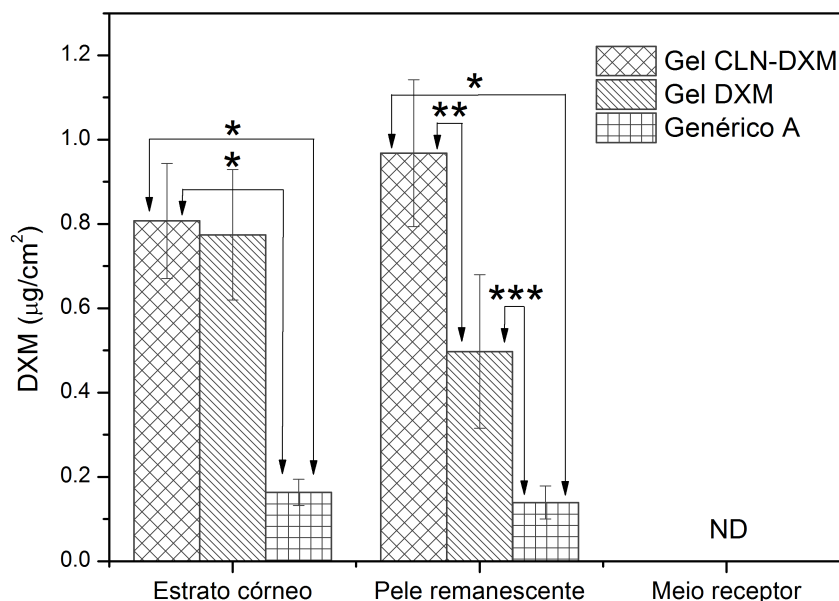
5.8 Penetração/permeação *in vitro* da DXM

A penetração/permeação *in vitro* da DXM em pele de orelha de porco (EC e pele remanescente) a partir das formulações Gel DXM, Gel CLN-DXM e creme de acetato de dexametasona genérico (Creme DXM) pode ser visualizada na Figura 46.

A avaliação da permeação cutânea foi realizada de acordo com a metodologia descrita na subseção 4.3.11. Nos tempos de coleta predeterminados, não foram verificados indícios de permeação cutânea da DXM em todas as formulações avaliadas, pois as amostras de meio receptor apresentaram leituras referentes à DXM inferiores ao limite de quantificação do método analítico (0,0656 µg/mL).

A penetração de DXM no EC foi de 0,80 µg/cm² ± 0,13, 0,77 µg/cm² ± 0,15 e 0,16 µg/cm² ± 0,03 para as formulações Gel CLN-DXM, Gel DXM e Creme DXM, respectivamente.

Figura 46 – Concentração de DXM no EC, pele remanescente e meio receptor após 12 horas de experimento *in vitro* em pele de orelha de porco (n=6).



Nota: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$; ND: não detectável

Fonte: produzido pelo autor.

Na pele remanescente, após a retirada do estrato córneo por *tape stripping*, foi encontrado DXM na concentração de $0,96 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0,17$, $0,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0,18$ e $0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0,03$ para as formulações Gel CLN-DXM, Gel DXM e Creme DXM, respectivamente.

A concentração de DXM presente no estrato córneo após 12 horas de experimento foi 5 vezes maior no grupo que recebeu a formulação contendo CLN (Gel CLN-DXM) em relação ao grupo que recebeu o creme genérico (Creme DXM). Na pele remanescente, o aumento da concentração de DXM no grupo que recebeu a formulação Gel CLN-DXM foi 5,3 vezes maior que no grupo que recebeu o creme genérico (Creme DXM).

A Tabela 41 apresenta a significância estatística (valor de p) da análise de variância ANOVA seguida pelo exame das diferenças entre as médias (teste t) efetuada sobre a quantidade acumulada de DXM encontrada no estrato córneo e pele remanescente das diferentes formulações avaliadas (Gel CLN-DXM, Gel DXM e Creme-DXM).

Não houve diferença significativa referente à DXM retida no EC entre os grupos Gel CLN-DXM e CLN-DXM, entretanto a diferença entre os grupos (Gel CLN-DXM e Creme DXM) e (Gel DXM e Creme-DXM) foi significativa ($p < 0,001$).

A concentração de DXM retida na pele remanescente foi significativa entre todas as formulações avaliadas com valores de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$ entre os grupos (Gel CLN-DXM e CLN-DXM), (Gel CLN-DXM e Creme DXM) e (Gel DXM e Creme-DXM), respectivamente.

Tabela 41 – Significância estatística entre a quantidade acumulada de DXM encontradas no estrato córneo e pele remanescente (n=6) das formulações avaliadas.

Grupos	Significância estatística (<i>p</i>)	
	Estrato córneo	Pele remanescente
Gel CLN-DXM e Gel DXM	não significativo	$p < 0,01$
Gel CLN-DXM e Creme DXM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gel DXM e Creme DXM	$p < 0,001$	$p < 0,05$

Fonte: Produzido pelo autor.

Todos os parâmetros referentes aos testes estatísticos que determinaram as diferenças entre as concentrações de DXM no EC e pele remanescente nas diferentes formulações avaliadas podem ser visualizados no Apêndice A e Apêndice B.

A pele de orelha de porco foi utilizada devido a sua similaridade à pele humana quanto a morfologia e permeabilidade (OECD, 2004). A temperatura do sistema de difusão utilizado no experimento de penetração e/ou permeação de DXM foi mantido em 32 °C para mimetizar as condições de temperatura da pele humana.

O tecido cutâneo apresenta, como uma de suas funções, proteção contra a ação de agentes externos. O estrato córneo, que consiste na camada em contato direto com o meio externo, confere esta ação protetora por meio do controle da penetração e difusão de substâncias através da pele (ESCOBAR-CHÁVEZ; DÍAZ-TORRES, 2012).

Formas farmacêuticas convencionais apresentam baixa penetração de fármaco na pele devido a vários fatores. Um deles é a pequena quantidade de fármaco que sofre partição no estrato córneo e, devido a isso, grande parte do mesmo continua na superfície da pele e é eliminado de diversas formas, como degradação por radiação UV e oxidação, eliminação por ação do suor, limpeza do local da aplicação, absorção no tecido da roupa.

A baixa eficiência de penetração diminui o efeito terapêutico da DXM, pois os receptores para glicocorticóides estão localizados na epiderme e derme (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008). Sendo assim, se não houver penetração da DXM no tecido cutâneo de forma adequada, o efeito terapêutico da DXM é prejudicado.

Para contornar este problema, há a necessidade de se desenvolver sistemas de liberação capazes de aumentar a penetração do fármaco nas camadas da pele e, conseqüentemente, a concentração nos locais de interesse terapêutico.

A formulação Gel CLN-DXM foi capaz de promover a penetração da DXM no EC e pele remanescente de forma eficiente, alcançando concentrações de DXM maiores que as obtidas nas demais formulações avaliadas e sem apresentar permeação. Desta forma, têm-se aumento do efeito terapêutico local associado a baixo risco de efeitos sistêmicos indesejáveis provocados pela permeação.

O incremento de penetração de fármaco nas camadas da pele provocado por

formulações contendo CLN em comparação à formas farmacêuticas convencionais possui vários exemplos na literatura (SANTOS MAIA et al., 2002; ZHAI; ZHAI, 2014; JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011; TUNG; HUYEN; CHI, 2015). Um deles foi descrito por Gaba et al. (2015), que obtiveram maior retenção do fármaco cloridrato de terbinafina incorporado em CLN na pele em comparação à forma farmacêutica convencional disponível no mercado.

Beber et al. (2016) desenvolveram nanocápsulas poliméricas contendo dexametasona e obtiveram retenção na epiderme viável ($0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e derme ($0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) menor que a encontrada neste trabalho. A diferença na retenção de dexametasona pode estar relacionada à influência da composição das nanopartículas na promoção de efeito oclusivo, que promove maior penetração e, conseqüentemente, retenção de fármaco nas camadas da pele.

Jensen, Petersson e Nielsen (2011) avaliaram a penetração cutânea do glicocorticoide betametasona valerato contido em NLS constituídos por diferentes lipídios e na forma farmacêutica convencional pomada. Os autores observaram uma quantidade significativamente maior de betametasona na pele quando utilizado a NLS em comparação à forma farmacêutica convencional.

O aumento da penetração de DXM observado na formulação Gel DXM-CLN pode ser atribuído ao efeito oclusivo promovido pelos CLN. O contato das nanopartículas na pele promove a formação de uma camada de CLN sobre o estrato córneo, que evita a perda de água do tecido cutâneo e aumenta a hidratação da pele (SONG; FAN; SHEN, 2016; GABA et al., 2015; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

O tamanho das nanopartículas é relevante para a ocorrência de efeito oclusivo, pois Müller, Radtke e Wissing (2002b) demonstraram que micropartículas lipídicas com tamanho de aproximadamente $4 \mu\text{m}$ apresentaram efeito oclusivo menor que 10 %, ao contrário de nanopartículas lipídicas com tamanho de 200 nm que apresentaram efeito oclusivo seis vezes maior que as micropartículas lipídicas.

Os CLN utilizados nas formulações avaliadas apresentaram tamanho médio de 173,26 nm (formulação 9, Tabela 34), adequado para proporcionar efeito oclusivo. O tamanho do CLN também está relacionado ao aumento da superfície de contato, que auxilia na penetração de fármacos nas camadas da pele.

A fixação do CLN na epiderme diminui o empacotamento dos corneócitos presentes no estrato córneo, abrindo canais entre as junções que mantinham o EC íntegro. A abertura destes canais facilita a penetração de fármaco na pele (ZHAI; ZHAI, 2014).

Segundo o estudo realizado por Sütő et al. (2016), onde foi avaliada a penetração e permeação cutânea de ibuprofeno incorporado em CLN, a penetração do ibuprofeno foi aumentada pelo CLN devido o contato direto das nanopartículas lipídicas com os lipídios constituintes do estrato córneo, que facilitou a penetração do fármaco através da pele.

Ghanbarzadeh et al. (2015) promoveram a penetração e retenção nas camadas da pele de hidroquinona contida em NLS em quantidade três vezes maior que hidroquinona

dispersa em gel de Carbopol[®], alcançando o objetivo de promover liberação direcionada à pele (*drug targeting*).

Os autores relatam também que a concentração de hidroquinona permeada foi 6,5 vezes menor na formulação com NLS, diminuindo assim a possibilidade de efeitos indesejáveis.

Ainda sobre o trabalho realizado por Ghanbarzadeh et al. (2015), segundo os autores, os fatores que contribuíram para o direcionamento do fármaco para locais específicos da pele e a baixa permeação foram: aumento da solubilidade da hidroquinona, aumento da superfície de contato das nanopartículas com a pele e efeito oclusivo e promotor de permeação das nanopartículas.

De acordo com Fang et al. (2008), há uma relação inversamente proporcional entre a permeação de um fármaco na pele e a lipofilicidade do mesmo. Os autores chegaram a esta conclusão após verificar a permeação em pele de três derivados do psoraleno dissolvidos em solução aquosa e constataram que as moléculas com maior solubilidade em água apresentaram maior permeação na pele.

A penetração no EC e pele remanescente apresentada pela formulação Gel DXM (Figura 46) pode ser atribuída à relação existente entre a permeação do fármaco e a solubilidade do mesmo em água.

Complementarmente, a diferença na quantidade de DXM que penetrou na pele entre as formulações Gel DXM e Creme DXM pode ser explicada pela diferença de solubilidade entre a DXM, utilizada na formulação Gel DXM, e a DXM acetato empregada no creme genérico avaliado (Creme DXM).

Tung, Huyen e Chi (2015) avaliaram a permeação em pele de camundongos da dexametasona acetato dispersa em gel de Carbopol[®] 940 e em pomada (cera emulsificante:vaselina:parafina líquida - 30:35:35).

Os resultados apresentados por Tung, Huyen e Chi (2015) mostraram que a DXM acetato contida no hidrogel teve maior permeação em comparação a presente na pomada. Os autores atribuíram esta diferença de permeação à afinidade entre o fármaco e a pomada que inibiu a liberação da DXM acetato do veículo.

6 CONCLUSÃO

- A composição de ácidos graxos do óleo de pracaxi evidenciou uma grande concentração de ácido behênico na composição do mesmo.
- A densidade, viscosidade dinâmica e cinemática do óleo de pracaxi em temperatura semelhante a de preparação dos CLN (90 °C) se mostrou adequada, pois encontram-se próximo aos valores apresentados por outros óleos vegetais comumente utilizados para preparação de CLN.
- O EHL requerido para o óleo de pracaxi em emulsões com os tensoativos Tween[®] 80 e Span[®] 60 foi determinado.
- O diagrama pseudoternário de fases apresentou uma região compreendida por emulsão líquido leitosa com a ocorrência de nanoemulsão em alguns pontos da referida região.
- O DSC e DRX das misturas de cera de carnaúba e óleo de pracaxi demonstraram que houve diminuição da organização da estrutura cristalina em comparação à cera de carnaúba pura e, conseqüentemente, utilizável para a preparação de CLN.
- A mistura de cera de carnaúba e óleo de pracaxi na proporção 60:40 permaneceu no estado sólido até a temperatura de 40 °C, evitando assim a possibilidade de surgimento de gotículas de óleo e a co-existência de uma emulsão O/A e os CLN.
- O coeficiente de partição (logP) negativo da DXM em óleo de pracaxi indica maior afinidade da DXM pela fase aquosa.
- A metodologia analítica em HPLC para quantificação de DXM em CLN e em matriz biológica (pele de orelha de porco) apresentou parâmetros adequados de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão exatidão e robustez.
- O planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}_{IV} mostrou que a concentração total de lipídios e de tensoativos foram os fatores significativos para diminuição do tamanho médio, PDI e aumento da eficiência de incorporação da DXM em CLN.
- O planejamento composto central indicou que a formulação com maior potencial de promover a penetração da DXM nas camadas da pele e, possivelmente, obter maior eficiência no tratamento de inflamações cutâneas.
- As formulações CLN-DXM e Gel DXM apresentaram liberação *in vitro* da DXM ajustada ao modelo cinético linear.
- A formulação Gel CLN-DXM apresentou liberação *in vitro* da DXM ajustada ao modelo cinético de Higuchi.
- Não houve permeação cutânea da DXM nas formulações avaliadas.

- A formulação Gel CLN-DXM apresentou penetração cutânea da DXM superior às formulações de DXM dispersa em gel de Carbopol[®] (Gel DXM) e creme genérico de DXM acetato (Creme DXM) em ensaios *in vitro* de penetração cutânea em pele de orelha de porco .

Referências

- ABDEL-MOTTALEB, M. M. a.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *International journal of pharmaceuticals*, v. 390, n. 2, p. 208–13, may 2010. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149853>>.
- ABDULKARIM, S. et al. Frying quality and stability of high-oleic Moringa oleifera seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*, v. 105, n. 4, p. 1382–1389, jan 2007. ISSN 03088146. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607004542>>.
- ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H.; VIJAYAN, K. Some Risks in the Construction and Analysis of Supersaturated Designs. *Technometrics*, Taylor & Francis, Ltd., v. 41, n. 2, p. 135, may 1999. ISSN 00401706. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1270729>>.
- ABRAMOVIC, H.; KLOFUTAR, C. The temperature dependence of dynamic viscosity for some vegetable oils. *Acta Chimica Slovenica*, v. 45, n. 1, p. 69–77, 1998. ISSN 1318-0207. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=10416>>.
- ABREGO, G. et al. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *International journal of pharmaceuticals*, feb 2016. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316300710>>.
- ALBERTI, I. et al. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *Journal of Controlled Release*, v. 71, n. 3, p. 319–327, apr 2001. ISSN 01683659. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901002449>>.
- ALI, H. et al. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. *International journal of pharmaceuticals*, v. 454, n. 1, p. 149–57, sep 2013. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313006145>>.
- ALMEIDA, A. J.; RUNGE, S.; MÜLLER, R. H. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 149, n. 2, p. 255–265, apr 1997. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517397048850>>.
- ANDERSON, M. J.; WHITCOMB, P. J. *DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation*. 1 edição. ed. Taylor & Francis, 2000. (DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation). ISBN 9781563272257. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=LHHHWXICg5QC>>.
- ANTONY, J. *Design of experiments for engineers and scientists*. Elsevier Science, 2003. 190 p. ISBN 0080469957. Disponível em: <<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Lg2iyehYXroC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Design+of+Experiments+for+Engineers+and+Scientists&ots=yMpdb7eWKb&sig=u39NPk>>.
- ARAÚJO, J. et al. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetate loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): in vitro and ex vivo studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8, p. 1034–1041, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963411005272>>.

ARAÚJO, J. et al. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetate-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 393, n. 1-2, p. 168–176, jun 2010. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517310002085>>.

ASAWALE, R.; MESHRAM, J.; KUMBHAR, V. Solid lipid nanoparticle as drug delivery system: an overview. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, v. 1, n. 5, p. 1–10, 2014. Disponível em: <http://www.pharmacie-globale.info/index.php?option=com{_}docman{\&}task=doc{_}view{\&}gid=361{\&}tmpl=component{\&}fo>.

ASTM. Standard D445: Standard test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids. *American National Standard Institute*, v. 552, n. 37, p. 184–189, 2013. Disponível em: <http://enterprise.astm.org/filtrexx40.cgi?+REDLINE{_}PAGES/D445>.

ASTM. Standard D7042: Test Method for Dynamic Viscosity and Density of Liquids by Stabinger Viscometer (and the Calculation of Kinematic Viscosity). *American National Standard Institute*, West Conshohocken, v. 12a, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://www.astm.org/Standards/D7042.htm>>.

ATTAMA, A. a.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. In: SEZER, A. D. (Ed.). *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. 1. ed. Rijeka, Croatia: Intech, 2012. cap. 5, p. 107–140. ISBN 978-953-51-0810-8. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/50486>>.

AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2, reimpre. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p. ISBN 9788536301525. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=dsh6PgAACAAJ>>.

AVERINA, E.; SEEWALD, G. Nanostructured lipid carriers (NLC) on the basis of Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. *Die Pharmazie*, v. 65, n. 1, p. 25–31, 2010. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2010/00000065/00000001/art00005>>.

BALOGH, T.; VELASCO, M.; PEDRIALI, C. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol.*, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n4/v86n4a16.pdf>>.

BANOV, D.; BANOV, F.; BASSANI, A. S. Case Series: The Effectiveness of Fatty Acids from Pracaxi Oil in a Topical Silicone Base for Scar and Wound Therapy. *Dermatology and therapy*, v. 4, n. 2, p. 259–269, nov 2014. ISSN 2193-8210. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410612>>.

BÁRÁNY, E.; LINDBERG, M.; LODÉN, M. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 195, n. 1-2, p. 189–195, feb 2000. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517399003889>>.

BARATA, G. Sobram razões para transformar biodiversidade em produtos. *Inovação Uniemp*, SciELO Brasil, v. 1, n. 3, p. 38–39, 2005. ISSN 1808-2394.

- BARATA, L. E. S. A economia verde: Amaazônia. *Ciência e Cultura*, v. 64, p. 31–35, 2012. ISSN 0009-6725.
- BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro*, Elsevier Ltd, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2009. ISSN 08872333. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>>.
- BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 99, n. 1, p. 21–50, jan 2010. ISSN 1520-6017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19670463>>.
- BASHAW, E. D. et al. Bioanalytical Method Validation: Concepts, Expectations and Challenges in Small Molecule and Macromolecule—A Report of PITTCON 2013 Symposium. *The AAPS Journal*, v. 16, n. 3, p. 586–591, may 2014. ISSN 1550-7416. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1208/s12248-014-9597-4>>.
- BASSANI, A.; BANOV, D. *Permeation enhancers with liposomes for topical formulations*. 2012. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2012109151>>.
- BASSON, I.; REYNHARDT, E. C. An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes. III. Montan wax. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 21, n. 9, p. 1434–1437, 2000. ISSN 0022-3727.
- BATTAGLIA, L. et al. Techniques for the Preparation of Solid Lipid Nano and Microparticles. In: SEZER, A. D. (Ed.). *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. 1. ed. Rijeka, Croatia: Intech, 2014. cap. 2, p. 51–75. ISBN 978-953-51-1628-8. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery>>.
- BEBER, T. C. et al. Cationic Polymeric Nanocapsules as a Strategy to Target Dexamethasone to Viable Epidermis: Skin Penetration and Permeation Studies. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 2, p. 1331–1338, feb 2016. ISSN 15334880. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2016.11670>>.
- BECK, R. Determinação Quantitativa da Dexametasona em Matéria-Prima e Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 20, n. 2, 2001. Disponível em: <<http://163.10.34.134/handle/10915/6955>>.
- BECK, R. C. R. et al. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 22, n. 1, p. 11–16, 2003. Disponível em: <<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6561>>.
- BECK, R. C. R. et al. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 67, n. 1, p. 18–30, aug 2007. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317124>>.
- BERNARDI, D. S. *Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase*. 124 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-11042011-140431/en.php>>.
- BHASKAR, K. et al. Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Lipids in health and disease*, v. 8, p. 6, 2009. Disponível em: <<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/19243632>>.

- BI, Y. et al. Characterization of the chemical composition of lotus plumule oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 20, p. 7672–7, oct 2006. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17002438>>.
- BOLZINGER, M. A. et al. *Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane*. 2012. 156–165 p.
- BORDEN, R. C. et al. Hyaluronic acid hydrogel sustains the delivery of dexamethasone across the round window membrane. *Audiology & neuro-otology*, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2011. ISSN 1421-9700. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000313506http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431286>>.
- BOS, J. D.; SPULS, P. I. Topical treatments in psoriasis: today and tomorrow. *Clinics in dermatology*, v. 26, n. 5, p. 432–7, jan 2008. ISSN 0738-081X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X07002489>>.
- BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. *The skin barrier in healthy and diseased state*. 2006. 2080–2095 p.
- BOX, G. Quality Quandaries:THE INVENTION OF THE COMPOSITE DESIGN. *Quality Engineering*, v. 12, n. 1, p. 119–122, aug 1999. ISSN 0898-2112. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08982119908962566>>.
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 13, n. 1, p. 1–45, jan 1951. ISSN 00359246. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2983966>>.
- BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, BRASIL, 2003.
- BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Wiley, 2003. 504 p. ISBN 9780470845745. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=2VMhevgIAIwC>>.
- BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. The British Pharmacopoeia. *British Pharmacopoeia*, Her Majesty's Stationery Office, 1941. ISSN 0003-2654. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=an941660204a>>.
- BROCK, J. et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 564–570, 2008. ISSN 0101-2061.
- BRONAUGH, R. L.; HOWARD I. MAIBACH. *Percutaneous Absorption: Drugs–Cosmetics–Mechanisms–Methodology: Drugs–Cosmetics–Mechanisms–Methodology*. [S.l.: s.n.], 1999. ISBN 1420000942.
- BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 465, n. 1-2, p. 1–37, aug 2002. ISSN 00032670. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267001014672>>.

BRÜHL, L. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, Section I. Ed. The AOCS Methods Editor and the AOCS Technical Department. 54 pages. AOCS Press, Champaign, 199. *Lipid / Fett*, WILEY-VCH Verlag, v. 99, n. 5, p. 197, 1997. ISSN 1521-4133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/lipi.19970990510>>.

CAMPARDELLI, R. et al. Lipid nanoparticles production by supercritical fluid assisted emulsion–diffusion. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 82, p. 34–40, oct 2013. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613002295>>.

CANSELIER, J. P.; POUX, M. Emulsion preparation: Theoretical notions and practical aspects. *PharmaChem*, p. 16–21, 2004.

CARDOSO, C. R. B. et al. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound repair and regeneration*, v. 12, n. 2, p. 235–43, 2004. ISSN 1067-1927. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086775>>.

CARVALHO, F. P. A. D. *Eco-eficiência na produção de pó de cera de carnaúba no município de Campo Maior (PI)*. 157 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal do Piauí, 2005.

CARVALHO, F. P. A. de; GOMES, J. M. A. Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, v. 46, n. 2, p. 421–453, jun 2008. ISSN 0103-2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032008000200006&lng=en&nrm>.

CASTRO, G. a. et al. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. *Journal of microencapsulation*, v. 24, n. 5, p. 395–407, aug 2007. ISSN 0265-2048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578730>>.

CATHERINE, W. T.-i.; VINCENT, B. B. *Testosterone Booster Transdermal Compositions*. 2015. 9 p. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2015/0065426.html>>.

CATHERINE, W. T.-i.; VINCENT, B. B. *Transdermal Delivery of Anastrozole for Systemic Effect*. 2015. 7 p. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2015/0065545.html>>.

CAVAZANA, W. C. et al. Açúcar (sacarose) e triglicerídeos de cadeia média com ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas cutâneas: estudo experimental em ratos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, p. 229–236, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962009000300003>>.

CEVC, G.; BLUME, G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1663, n. 1-2, p. 61–73, 2004. ISSN 00052736.

CHAKRABORTY, B. et al. Developing multicomponent interventions using fractional factorial designs. *Statistics in Medicine*, v. 28, n. 21, p. 2687–2708, 2009. ISSN 02776715.

CHEN, H. et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of controlled release*, v. 110, n. 2, p. 296–306, jan 2006. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325954>>.

CHEN, P. C.; HUANG, J. W.; PANG, J. An investigation of optimum nlc-sunscreen formulation using taguchi analysis. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, 2013. ISSN 16874110.

CHEN, R. *Purification, characterization and cDNA cloning of a trypsin inhibitor from Pentaclethra macroloba*. 203 p. Tese (Doutorado) — University of Oklahoma, 1998.

CHEN, R.; SCHUBERT, K.; CZAPLA, T. *Trypsin inhibitors with insecticidal properties obtained from Pentaclethra macroloba*. 1999. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US6384302>>.

CHI, S. Effect of penetration enhancers on flurbiprofen permeation through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 126, n. 1-2, p. 267–274, dec 1995. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517395041370>>.

CHOUDHURY, H. et al. Improvement of cellular uptake, in vitro antitumor activity and sustained release profile with increased bioavailability from a nanoemulsion platform. *International journal of pharmaceutics*, v. 460, n. 1-2, p. 131–43, jan 2014. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313009861>>.

CHUN, J. et al. Pentaclethra macroloba Seed Effect on Larval Growth, Cell Viability, and Midgut Enzyme Activity of Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 87, n. 6, p. 1754–1760, dec 1994. Disponível em: <<http://jee.oxfordjournals.org/content/87/6/1754.abstract>>.

CLARES, B. et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *International journal of pharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 473, n. 1-2, p. 591–8, aug 2014. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314005560>>.

COLEMAN, D. E.; MONTGOMERY, D. C. A Systematic Approach to Planning for a Designed Industrial Experiment. *Technometrics*, v. 35, n. 1, p. 1–12, mar 2012.

COLLINS, L. M.; DZIAK, J. J.; LI, R. Design of experiments with multiple independent variables: a resource management perspective on complete and reduced factorial designs. *Psychological methods*, v. 14, n. 3, p. 202–224, 2009. ISSN 1082-989X.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 2, p. 123–33, may 2001. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297896>>.

CRISTINA, M. et al. Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 1, p. 87–92, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-82502009000100010{&}script=sci{_}a>.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, Springer New York, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-010-9563-0>>.

DAS, S. et al. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 88, n. 1, p. 483–9, nov 2011. ISSN 1873-4367. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831615>>.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 47, n. 1, p. 139–51, aug 2012. ISSN 1879-0720. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664358>>.

DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 44, n. 8, p. 640–645, 1992. ISSN 00223573.

DOKTOROVÁ, S. et al. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 75, n. 2, p. 538–42, feb 2010. ISSN 1873-4367. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879736>>.

EATON, W.; ANDERSON, C.; SAUNDERS, E. The impact of *Pentaclethra macroloba* on soil microbial nitrogen fixing communities and nutrients within developing secondary forests in the Northern Zone of Costa Rica. *Tropical Ecology*, v. 53, n. 2, p. 207–214, 2012. Disponível em: <http://tropecol.com/pdf/open/PDF{_}53{_}2/Jour-10>.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, v. 33, n. 4, p. 217–225, 1995. ISSN 01051873.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, v. 33, n. 4, p. 217–225, 1995. ISSN 1600-0536. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00470.x>>.

EINMAHL, S. et al. Concomitant and controlled release of dexamethasone and 5-fluorouracil from poly(ortho ester). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 185, n. 2, p. 189–198, aug 1999. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517399001490>>.

El Maghraby, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. *Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes*. 2008. 203–222 p.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J.; DÍAZ-TORRES, R. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, p. 3–17, 2012. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=14480>>.

ESTEBAN, B. et al. Temperature dependence of density and viscosity of vegetable oils. *Biomass and Bioenergy*, v. 42, p. 164–171, 2012. ISSN 09619534.

FANG, J.-Y. et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, n. 2, p. 633–640, oct 2008. ISSN 09396411. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.05.008>>.

- FANGUEIRO, J. F. et al. Experimental Factorial Design Applied to Mucoadhesive Lipid Nanoparticles via Multiple Emulsion Process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 100, n. 1, p. 84–89, dec 2012. ISSN 1873-4367. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.014>>.
- FARIAS, J. M. D. *Emulsão de cera de carnaúba associada a fungicida como alternativa à modificação da atmosfera de armazenamento em coco verde in natura*. 104 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal do Ceará, 2008.
- FAROOQ, M. A. et al. An innovative approach for planning and execution of pre-experimental runs for Design of Experiments. *Investigaciones Europeas de Direccion y Economia de la Empresa*, mar 2015. ISSN 11352523.
- FARTASCH, M. The nature of the epidermal barrier: Structural aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 18, n. 3, p. 273–282, 1996. ISSN 0169409X.
- FASINA, O.; COLLEY, Z. Viscosity and Specific Heat of Vegetable Oils as a Function of Temperature: 35°C to 180°C. *International Journal of Food Properties*, v. 11, n. 4, p. 738–746, nov 2008. ISSN 1094-2912. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910701586273>>.
- FERREIRA, M. R. a. et al. Development and evaluation of emulsions from Carapa guianensis (Andiroba) oil. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 3, p. 1383–1390, 2010. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-010-9491-z>>.
- FISHER, R. A. *The Design of Experiments*. 9. ed. Royal Oak: Hafner, 1974. 248 p. ISBN 9780028446905. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=TV5XRAAACAAJ>>.
- FLOURY, J. et al. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, v. 59, n. 4, p. 843–853, feb 2004. ISSN 00092509. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250903005591>>.
- FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *Journal of Investigative Dermatology*, Elsevier Masson SAS, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975. ISSN 0022202X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15444835>>.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641198000745>>.
- FRIEDRICH, R.; FONTANA, M.; BECK, R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quim Nova*, v. 31, n. 5, p. 1131–1136, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n5/a38v31n5.pdf>>.
- FRIEND, D. R. In vitro skin permeation techniques. *Journal of Controlled Release*, v. 18, n. 3, p. 235–248, 1992. ISSN 01683659.

FUNASAKI, M. et al. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. *Química Nova*, SBQ, v. 39, n. 2, p. 194–209, 2016. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000200194&lng=en&nrm>.

GABA, B. et al. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, v. 53, n. 2, p. 147–159, oct 2015. ISSN 1110-0931. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093115000289><http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2015.10.001>>.

GALLARATE, M. et al. Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation. *Journal of Microencapsulation*, v. 26, n. 5, p. 394–402, jul 2009. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/02652040802390156>>.

GARCIA-FUENTES, M. et al. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 25, n. 1, p. 133–43, may 2005. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098705000680>>.

GARCIA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 27, n. 2-3, p. 159–168, feb 2003. ISSN 09277765. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777650200053X>>.

GARCÍA-GONZÁLEZ, C. et al. Encapsulation efficiency of solid lipid hybrid particles prepared using the PGSS® technique and loaded with different polarity active agents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, n. 3, p. 342–347, sep 2010. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844610001695>>.

GASCO, M. R. *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution*. United States Patent 5,250,236, 1993. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US5250236>>.

GASCO, M. R. Solid Lipid Nanospheres from Warm Micro-Emulsions: Improvements in SLN production for more efficient drug delivery. *Pharmaceutical Technology Europe*, v. 9, p. 52–58, 1997.

GASCO, M. R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 377–378, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X07000762>>.

GHANBARZADEH, S. et al. Enhanced stability and dermal delivery of hydroquinone using solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 1004–1010, oct 2015. ISSN 18734367. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776515302721>>.

GODIN, B.; TOUITOU, E. *Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*. 2007. 1152–1161 p.

GOINDI, S.; NARULA, M.; KALRA, A. Microemulsion-Based Topical Hydrogels of Tenoxicam for Treatment of Arthritis. *AAPS PharmSciTech*, aug 2015. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1208/s12249-015-0383-0>>.

GOKCE, E. H. et al. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International journal of nanomedicine*, v. 7, p. 1841–50, jan 2012. ISSN 1178-2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3352689&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.

GÓMEZ-GAETE, C. et al. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceuticals*, v. 331, n. 2, p. 153–9, mar 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157461>>.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. *Clinics in dermatology*, v. 26, n. 6, p. 614–26, jan 2008. ISSN 0738-081X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X07001940>>.

GRAMDORF, S. et al. Crystallized miniemulsions: Influence of operating parameters during high-pressure homogenization on size and shape of particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, n. 1-2, p. 108–113, dec 2008. ISSN 09277757. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708004676>>.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface active agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 1, p. 311–326, 1949.

GULLAPALLI, R. P.; SHETH, B. B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 48, n. 3, p. 233–238, 1999.

GUNSTONE, F. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. 2. ed. Wiley, 2011. 376 p. ISBN 9781444339918. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=lnk2tdo8{_}](https://books.google.com.br/books?id=lnk2tdo8{_}>)>.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 305, n. 1-2, p. 2–12, 2005. ISSN 03785173.

HAMISHEHKAR, H. et al. A comparative histological study on the skin occlusion performance of a cream made of solid lipid nanoparticles and Vaseline. *Research in pharmaceutical sciences*, v. 10, n. 5, p. 378–87, jan. ISSN 1735-5362. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4691958&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.

HAMM, W. et al. *Edible Oil Processing*. 2. ed. John Wiley & Sons, 2013. 350 p. ISBN 9781444336849. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=-R6BrfKyKJMC>>.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707007741>>.

HANSCH, C.; LEO, A. *Exploring QSAR*. Washington: American Chemical Society, 1995. (ACS Professional Reference Book). ISBN 0841229872.

HEARD, C. M.; SCREEN, C. Probing the permeation enhancement of mefenamic acid by ethanol across full-thickness skin, heat-separated epidermal membrane and heat-separated dermal membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 349, n. 1-2, p. 323–325, 2008. ISSN 03785173.

HENGGE, U. R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 54, n. 1, p. 1–15, jan 2006. ISSN 01909622. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962205002550>>.

HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 4, p. 1526–1540, dec 2010. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-010-9526-5/fulltext.html>>.

HORN, E. J. et al. Topical corticosteroids in psoriasis: strategies for improving safety. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, v. 24, n. 2, p. 119–24, feb 2010. ISSN 1468-3083. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175860>>.

HU, F. et al. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 239, n. 1-2, p. 121–128, jun 2002. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302000819>>.

HU, F.-Q. et al. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *International journal of pharmaceutics*, v. 314, n. 1, p. 83–9, may 2006. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306001025>>.

HU, X. et al. Influence of liquid lipid content on the properties of puerarin-loaded lipid nanoparticles. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, v. 2, n. 1, p. 9–19, jan 2014. ISSN 2224-3682. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/22243682.2013.879369>>.

HUUSKONEN, J.; SALO, M.; TASKINEN, J. Neural network modeling for estimation of the aqueous solubility of structurally related drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 86, n. 4, p. 450–4, apr 1997. ISSN 0022-3549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109047>>.

ICI AMERICAS, I. *The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection*. [s.n.], 1984. 19 p. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924194>>.

IGARTUA, M. et al. Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 233, n. 1, p. 149–157, 2002. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730100936X>>.

IVANOV, I. B.; DANOV, K. D.; KRALCHEVSKY, P. A. Flocculation and coalescence of micron-size emulsion droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, n. 1-2, p. 161–182, jul 1999. ISSN 09277757. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775798006207>>.

IVANOV, I. B.; KRALCHEVSKY, P. A. Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. [S.l.: s.n.], 1997. v. 128, n. 1-3, p. 155–175. ISBN 0927-7757. ISSN 09277757.

JAIN, S. K. et al. Solid Lipid Nanoparticles Bearing Flurbiprofen for Transdermal Delivery. *Drug Delivery*, v. 12, n. 4, p. 207–215, oct 2008. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10717540590952591>>.

JANTHARAPRAPAP, R.; STAGNI, G. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels. *International journal of pharmaceuticals*, v. 343, n. 1-2, p. 26–33, oct 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307003298>>.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a (1)H-NMR study. *International journal of pharmaceuticals*, v. 205, n. 1-2, p. 15–21, oct 2000. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000538>>.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J. Control. Release*, v. 66, n. 2-3, p. 115, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00223-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00223-0)>.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, n. 2, p. 167–177, apr 2000. ISSN 03785173. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00378-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00378-1)>.

JENSEN, L. B. et al. Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceuticals*, v. 390, n. 1, p. 53–60, may 2010. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836439>>.

JENSEN, L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 79, n. 1, p. 68–75, sep 2011. ISSN 1873-3441. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964111100172X>>.

JOKER, DORTHE; SALAZAR, R. Pentaclethra macroloba. *Seed Leaflet*, v. 35, 2000. Disponível em: <http://forskning.ku.dk/find-en-forsker/?pure=files/20648424/pentaclethra{_}macroloba{_}i>.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *International journal of pharmaceuticals*, v. 346, n. 1-2, p. 124–32, jan 2008. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651933>>.

JOSHI, M. D.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 71, n. 2, p. 161–72, feb 2009. ISSN 1873-3441. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108003391>>.

JUNYAPRASERT, V. B. et al. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, n. 1–2, p. 207–214, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309003044>>.

KALOGIANNI, E. P.; KARAPANTSIOS, T. D.; MILLER, R. Effect of repeated frying on the viscosity, density and dynamic interfacial tension of palm and olive oil. *Journal of Food Engineering*, v. 105, n. 1, p. 169–179, 2011. ISSN 02608774.

KAMBLE, M. S. et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – an overview. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, v. 2, n. 4, p. 681–691, 2012.

KAO, J. S. et al. Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: Inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 120, n. 3, p. 456–464, 2003. ISSN 0022202X.

KASONGO, K. W.; MÜLLER, R. H.; WALKER, R. B. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 17, n. 3, p. 353–362, jan 2011. ISSN 1083-7450. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2010.542163>>.

KASONGO, K. W. et al. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 100, n. 12, p. 5185–96, dec 2011. ISSN 1520-6017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020815>>.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Development and characterization of a novel controlled release transdermal delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam. *Life sciences*, v. 93, n. 21, p. 763–772, oct 2013. ISSN 1879-0631. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113071>>.

KIM, J. et al. Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chemistry*, v. 118, n. 2, p. 398–402, 2010. ISSN 03088146.

KIM, J. H. et al. Preparation of a Capsaicin-Loaded Nanoemulsion for Improving Skin Penetration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 3, p. 725–732, jan 2014. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404220n>>.

KORTING, H.; KERSCHER, M.; SCHÄFER-KORTING, M. Topical glucocorticoids with improved benefit/risk ratio: Do they exist? *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 27, n. 1, p. 87–92, jul 1992. ISSN 01909622. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0190962292701629>>.

KOVACEVIC, A. et al. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International journal of pharmaceuticals*, v. 406, n. 1-2, p. 163–72, mar 2011. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219990>>.

KUMAR, B. P. Solid lipid nanoparticles - a brief review. *International Journal of Advanced Pharmaceuticals*, v. 2, n. 1, p. 35–55, 2012.

KUNTSCHE, J. et al. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. *International Journal of Pharmaceuticals*,

v. 354, n. 1-2, p. 180–195, apr 2008. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307006965>>.

LACATUSU, I. et al. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable oils with multiple health beneficiaries. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier B.V., v. 246, p. 311–321, feb 2014. ISSN 13858947. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894714001880>>.

LACERDA, S. D. P. *Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnaúba: Desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3*. 188 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal de Pernambuco, 2009. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/3278/arquivo2158{_}1.pdf?sequence=1{\&}isAll>.

LACERDA, S. P.; CERIZE, N. N. P.; RÉ, M. I. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. *International Journal of Cosmetic Science*, Blackwell Publishing Ltd, v. 33, n. 4, p. 312–321, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00626.x>>.

LACHMAN, L. et al. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. ISBN 9789723109085. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=caUzAAAACAAJ>>.

LARSSON, K. Classification of glyceride crystal forms. *Acta chemica Scandinavica*, v. 20, n. 8, p. 2255–2260, 1966. ISSN 0904-213X.

LEAL, I. C. R. et al. Pentaclethra macroloba tannins fractions active against methicillin-resistant staphylococcal and Gram-negative strains showing selective toxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 6, p. 991–999, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2011005000132{\&}script=sci{_}a>.

LEE, J. K. et al. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro*, v. 14, n. 4, p. 345–349, aug 2000. ISSN 08872333. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S08872333000028X>>.

LI, S.-S. et al. The percutaneous permeability and absorption of dexamethasone esters in diabetic rats: a preliminary study. *Drug Delivery*, v. 21, n. 1, p. 17–25, 2014. ISSN 1071-7544. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2013.838809>>.

LI, Z. et al. Bovine serum albumin loaded solid lipid nanoparticles prepared by double emulsion method. *Chem Res Chinese Universities*, v. 26, n. 50472069, p. 136–141, 2010. Disponível em: <<http://www.cjcu.jlu.edu.cn/hxyj/EN/article/downloadArticleFile.do?attachType=PDF{\&}id=12>>.

LI, Z. et al. Studies on crystallinity state of puerarin loaded solid lipid nanoparticles prepared by double emulsion method. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 99, n. 2, p. 689–693, jun 2009. ISSN 1388-6150. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10973-009-0127-z>>.

LIN, X. et al. Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,

- v. 311, n. 1-3, p. 106–111, dec 2007. ISSN 09277757. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707006255>>.
- LIU, C.-H.; WU, C.-T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf.*, v. 353, n. 2-3, p. 149, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.11.006>>.
- LIU, G. Y.; WANG, J. M.; XIA, Q. Application of nanostructured lipid carrier in food for the improved bioavailability. *European Food Research and Technology*, v. 234, n. 3, p. 391–398, 2012. ISSN 1438-2377. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1645-z>>.
- LIU, J. et al. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International journal of pharmaceuticals*, v. 328, n. 2, p. 191–5, jan 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978810>>.
- LIU, K. et al. Preparation and Characterization of 10-Hydroxycamptothecin Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 34, n. 5, p. 465–471, 2008. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/03639040701662230>>.
- LOO, C.; BASRI, M.; ISMAIL, R. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 13–22, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534299/>>.
- LOPEZ, R. F.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. L. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 200, n. 1, p. 127–132, apr 2000. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300003653>>.
- LUCKS, S.; MÜLLER, R. *Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - sln)*. European Patent EP0000605497, 1996. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/EP0605497B1?cl=en>>.
- LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 42, n. 1-2, p. 3–40, 1998. ISSN 01697439.
- LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v. 114, n. 1, p. 53–9, aug 2006. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828192>>.
- MACEDO, J. P. F. et al. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech*, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2006. ISSN 1530-9932.
- MACHATHA, S. G.; YALKOWSKY, S. H. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP[®], ACDlogP and KowWin[®] to experimentally determined values. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, n. 1-2, p. 185–192, apr 2005. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851730500092X>>.

MÄDER, K.; MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 2001. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311991>>.

MAIA, C.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 196, n. 2, p. 165–167, mar 2000. ISSN 03785173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517399004135>>.

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, n. 1–2, p. 132–138, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308004651>>.

MARANGONI, A. G.; NARINE, S. S. *Physical Properties of Lipids*. CRC Press, 2002. 592 p. ISBN 9780203909171. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=OCBav13l{_}](https://books.google.com.br/books?id=OCBav13l{_}>)>.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, VI, n. 2, p. 1–37, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/6545/4804>>.

MARCHIORI, M. L. et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 36, n. 8, p. 962–71, aug 2010. ISSN 1520-5762. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590450>>.

MARTÍN, Á. et al. Micronization of polyethylene glycol by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying of aqueous solutions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 49, n. 12, p. 1259–1266, dec 2010. ISSN 02552701. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255270110002400>>.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados Ômega-3 e Ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutricao*, v. 19, p. 761–770, 2006. ISSN 14155273.

MARUNO, M. *Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele*. 166 p. Tese (Tese de Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-22102009-154453/en.php>>.

MASON, R.; GUNST, R.; HESS, J. *Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science*. 2. ed. New Jersey: Wiley, 2003. ISBN 0-471-37216-1. Disponível em: <<http://epubs.siam.org/doi/pdf/10.1137/1.9781611971149.fmhhttp://books.google.com/books?hl=en&lr={&}id=7bOjF4n9RzIC{&}oi=fnd{&}pg=PR7{&}dq=Statistical+design+and+analysis+of+experiments+-+With+Applications+to+Engineering+and+Science{&}ots=4rwb-gmIw>>.

MEHANNA, M. M.; MOTAWAA, A. M.; SAMAHA., M. W. Pharmaceutical particulate carriers: Lipid - based carriers. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*, v. 2, n. 1, p. 10–22, 2012. Disponível em: <<http://www.scopemed.org/?mno=8219>>.

- MENDES, a. I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, Elsevier B.V., v. 111C, p. 755–763, jul 2013. ISSN 1873-4367. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954816>>.
- MEYER, G. *Pentaclethra macroloba* (Willd .) Kuntze. *Academia Nacional de Ciencias de Costa Rica*, p. 601–604, 1993.
- MILANOVIC, J. et al. Carnauba wax microparticles produced by melt dispersion technique. *Chemical Papers*, v. 65, n. 2, p. 213–220, jan 2011. ISSN 0366-6352. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11696-011-0001-x>>.
- MILANOVIC, J. et al. Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors*, v. 10, n. 1, p. 901–12, jan 2010. ISSN 1424-8220. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3270876&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.
- MITREA, E.; OTT, C.; MEGHEA, A. New Approaches on the Synthesis of Effective Nanostructured Lipid Carriers. *Revista de Chimie*, v. 65, n. 1, p. 50–55, 2014. Disponível em: <<http://www.revistadechimie.ro/pdf/MITREAE.pdf114.pdf>>.
- MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 414, n. 1–2, p. 267–275, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311004030>>.
- MOGHIMIPOUR, E. et al. Preparation and Characterization of Dexamethasone Microemulsion Based on Pseudoternary Phase Diagram. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, v. 8, n. 3, p. 105–112, jul 2013. ISSN 1735-7780. Disponível em: <http://www.jjnpp.com/?page=article&article{_}i>.
- MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 8. ed. [S.l.]: Wiley, 2012. 730 p. ISBN 9781118214718.
- MORAIS, A. R. d. V. et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International journal of pharmaceutics*, v. 503, n. 1, p. 102–114, mar 2016. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316301533>>.
- MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, n. 2, p. 103–112, 2001.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 161–77, jul 2000. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840199>>.
- MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 522–530, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X07000464>>.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302001801>>.

- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. a. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54 Suppl 1, p. S131–55, nov 2002. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460720>>.
- NAM, S. H.; JI, X. Y.; PARK, J. S. Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 32, n. 3, p. 956–960, 2011. Disponível em: <http://www.journal.kcsnet.or.kr/main/j{_}search/j{_}abstract{_}view.htm?code=B110336{\&}qpage=j{_}search{\&}spa>.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria*. 4. ed. Port Alegre: Bookman, 2010. 414 p. ISBN 9788577807130. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=FDnT9ygeOcc>>.
- NG, S.-F. et al. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 3, p. 1432–1441, 2010. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-010-9522-9>>.
- NGUYEN, H. et al. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of Microencapsulation*, v. 99, n. 6, p. 596–604, 2012. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/02652048.2012.668960>>.
- NICULAE, G. et al. Influence of vegetable oil on the synthesis of bioactive nanocarriers with broad spectrum photoprotection. *Central European Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 837–850, jan 2014. ISSN 1895-1066. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2478/s11532-014-0503-9>>.
- OECD. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. OECD Publishing, n. 28, 2004. Disponível em: <[/content/book/9789264078796-enhttp://dx.doi.org/10.1787/9789264078796-en](http://dx.doi.org/10.1787/9789264078796-en)>.
- OHYAMA, K. E. M. C. H. I. Three-Phase Behavior and HLB Numbers of Bile Salts and Lecithin in a Water-Oil System Three-Phase Behavior of Bile Salts. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 136, n. 2, p. 432–439, 1990.
- OLIVEIRA, A. a. et al. Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. *SpringerPlus*, v. 2, p. 371, jan 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3738913{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=ab>>.
- OLIVEIRA, B. *Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti*. 108 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-31032009-132918/en.php>>.
- O'NEIL, M. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Royal Society of Chemistry, 2013. 2708 p. (Merck Index). ISBN 9781849736701. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=gVL{_}AAAAQ>.
- ORAFIDIYA, L.; OLADIMEJI, F. Determination of the required HLB values of some essential oils. *International journal of pharmaceutics*, v. 237, p. 241–249, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302000510>>.

- ORATA, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, p. 83–156, 2012. Disponível em: <<http://forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2013/02/Analytical-derivatization-.pdf>>.
- PANDOLFE, W. D. Effect Of Dispersed And Continuous Phase Viscosity On Droplet Size Of Emulsions Generated By Homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 2, n. 4, p. 459–474, jan 1981. ISSN 0193-2691. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/01932698108943924>>.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 366, n. 1-2, p. 170–184, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308006996>>.
- PARDEIKE, J. et al. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 419, n. 1–2, p. 329–338, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731100754X>>.
- PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, Springer New York, v. 10, n. 3, p. 985–992, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-009-9287-1>>.
- PATIDAR, A. et al. A review on novel lipid based nanocarriers. *Int J Pharm and Pharm Sci*, v. 2, n. 4, p. 30–35, 2010.
- PEREIRA, G. *Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões*. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-31032009-143222/en.php>>.
- PEREIRA, R. B. *O extrato vegetal de pracaxi (Pentaclethra macroloba, kuntze) em substituição a um antibiótico promotor de crescimento utilizado para frangos de corte*. 65 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.
- PEZESHKI, A. et al. Encapsulation of Vitamin A Palmitate in Nanostructured Lipid Carrier (NLC)-Effect of Surfactant Concentration on the Formulation Properties. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 4(Supp2), p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312406/>>.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, v. 33, n. 4, p. 305–325, jun 1946. ISSN 00063444. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332195>>.
- POHLMANN, R. B. S. G. A. *Nanocosmetics and Nanomedicines*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-19791-8. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19792-5>>.
- POLING, B.; PRAUSNITZ, J.; O'CONNELL, J. *The Properties of Gases and Gas Mixtures*. 5. ed. [S.l.]: McGraw Hill, 2000. 768 p. ISBN 0071499997.

- POPLE, P.; SINGH, K. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech*, Springer New York, v. 7, n. 4, p. E63–E69, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/pt070491>>.
- POTTHAST, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 94, n. 10, p. 2121–31, oct 2005. ISSN 0022-3549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136567>>.
- PRAUSNITZ, M. R. et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. In: BOLOGNIA, J.; JORIZZO, J.; SCHAFFER, J. (Ed.). *Dermatology*. [S.l.]: Elsevier Health Sciences., 2008. p. 2065–2073. ISBN 0723435715.
- RAHMAN, Z. et al. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. *International journal of pharmaceutics*, v. 389, n. 1-2, p. 186–94, apr 2010. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086023&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.
- RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. . . . *Investigational Dermatology*, v. 7, p. 23–34, jan 2014. ISSN 1178-7015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3891488&tool=pmcentrez&rendertype=abstracthttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38>>.
- RATHBURN, H.; CZAPLA, T.; SCHUBERT, K. *Pentaclethera macroloba protein having insecticidal properties*. 1997. 2829–2833 p. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US5672680>>.
- RAVI, P. R. et al. Lipid nanoparticles for oral delivery of raloxifene: Optimization, stability, in vivo evaluation and uptake mechanism. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 87, n. 1, p. 114–124, dec 2014. ISSN 1873-3441. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641113003974>>.
- RAY II, J. R. *Topical compositions to treat circulatory disorders*. United States Patent 8895036, 2015. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2015/0025443.html>>.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. ISSN 01004042.
- RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quimica Nova*, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008. ISSN 01004042.
- RICCI, M. et al. Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, n. 5, p. 1149–1159, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.20335>>.
- RIVIERE, J. E. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*. 1. ed. Taylor & Francis, 2005. ISBN 0415700361,9780415700368,9780203020821. Disponível em: <<http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=7DDF5B18519B39BA5098C756210052AC>>.
- RODENBUSH, C. M.; HSIEH, F. H.; VISWANATH, D. S. Density and viscosity of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 12, p. 1415–1419, dec 1999. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11746-999-0177-1>>.

RODRIGUES, A. M. d. C.; DARNET, S.; SILVA, L. H. M. da. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Brazilian Chemical Society, v. 21, n. 10, p. 2000–2004, 2010. ISSN 0103-5053. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532010001000028&lng=en&nrm>.

ROSSAN, M. R. *Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas Lipídicas Sólidas para Aplicação em Cosméticos*. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Estadual de Campinas, 2011.

RUCKENSTEIN, E. Microemulsions, Macroemulsions, and the Bancroft Rule. *Langmuir*, v. 12, n. 26, p. 6351–6353, 1996. ISSN 0743-7463. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la960849m>>.

RUCKENSTEIN, E. Thermodynamic insights on macroemulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 79, n. 1, p. 59–76, 1999. ISSN 00018686.

RUFINO, J. L. et al. Determination of ambroxol in syrups using diffuse reflectance spectroscopy. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1513–1516, 2009. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600029&lng=en&nrm>.

RYAN, E. et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International journal of food sciences and nutrition*, v. 57, n. 3-4, p. 219–228, 2006. ISSN 0963-7486.

SALIMI, A.; NEZHAD, M. S.; MOGHIMIPOUR, E. In-vitro Permeation of Dexamethasone Microemulsion Through Rat Skin. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, v. 4, n. 1, p. 30–34, 2015.

SALMASO, S. et al. Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas-assisted melting atomization process. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 98, n. 2, p. 640–50, feb 2009. ISSN 1520-6017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484622>>.

SAMEIN, L. H. Preparation and evaluation of nystatin loaded solid-lipid nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 1, p. 44–51, 2014. Disponível em: <<http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ajpr&volume=4&issue=1&ar>>.

SANAD, R. et al. Formulation of a Novel Oxybenzone-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs). *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 4, p. 1684–1694, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-010-9553-2>>.

SANGSTER, J. *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. Wiley, 1997. (Wiley Series in Solutions Chemistry). ISBN 9780471973973. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=a29M2F2ppnUC>>.

SANTIAGO, G. et al. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 187–190, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v15n3/a03v15n3.pdf>>.

SANTOS COSTA, M. N. F. et al. Characterization of Pentaclethra macroloba oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Springer Netherlands, v. 115, n. 3, p. 2269–2275, mar 2013. ISSN 1388-6150. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10973-012-2896-z>>.

SANTOS, F. R. A. dos. *Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações*. 68 p. Tese (Dissertação de Mestrado) — Univesidade Fernando Pessoa, 2011. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2465/3/TM{_}16427>.

SANTOS, J.; SANTOS, I.; SOUZA a.G. Effect of heating and cooling on rheological parameters of edible vegetable oils. *Journal of Food Engineering*, v. 67, n. 4, p. 401–405, apr 2005. ISSN 02608774. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404002201>>.

SANTOS MAIA, C. et al. Drug Targeting by Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Use. *Journal of Drug Targeting*, Informa UK Ltd UK, v. 10, n. 6, p. 489–495, jan 2002. ISSN 1061-186X. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/1061186021000038364>>.

SANTOS, P. et al. Formulation issues associated with transdermal fentanyl delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 416, n. 1, p. 155–159, 2011. ISSN 03785173.

SARFARAZ, M. et al. Enhancement of Anti-Dermatitis Potential of Clobetasol Propionate by DHA [Docosahexaenoic Acid] Rich Algal Oil Nanoemulsion Gel. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 35–52, 2016. Disponível em: <http://ijpr.sbm.ac.ir/article{_}1822{_}8>.

SARMENTO, B. et al. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, v. 2, n. 4, p. 743–9, jan 2007. ISSN 1176-9114. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676823&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 427–443, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X07000403>>.

SCHWARZ, J. C. et al. Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *International journal of pharmaceutics*, v. 437, n. 1-2, p. 83–8, nov 2012. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312007971>>.

SEVERINO, P. et al. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86, n. 1, p. 125–130, 2011.

SHAH, R. et al. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *Journal of Physical Science*, v. 25, n. 1, p. 59–75, 2014. Disponível em: <<http://web.usm.my/jps/25-1-14/25-1-4.pdf>>.

SHAKEEL, F. et al. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS PharmSciTech*, v. 8, n. 4, p. E104, oct 2007. ISSN 1530-9932. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1208/pt0804104>>.

SHAKEEL, F. et al. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *Expert opinion on drug delivery*, v. 9, n. 8, p. 953–74, aug 2012. ISSN 1744-7593. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703228>>.

SHEBITZ, D.; EATON, W. Forest Structure, Nutrients, and *Pentaclethra macroloba* Growth after Deforestation of Costa Rican Lowland Forests. *ISRN Ecology*, v. 2013, p. 27–31, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/isrn/ecology/2013/414357/>>.

SHEGOKAR, R.; SINGH, K. K.; MÜLLER, R. H. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles—from lab to industrial scale. *International journal of pharmaceutics*, v. 416, n. 2, p. 461–70, sep 2011. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727389>>.

SHEN, H.; ZHONG, M. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing atorvastatin. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 58, n. 9, p. 1183–91, sep 2006. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945176>>.

SHINODA, K. The comparison between the PIT system and the HLB-value system to emulsifier selection. *Proceedings of the 5th International Congress of Surface Activity*, v. 2, p. 275–283, 1969.

SHOSHTARI, S.; WEN, J.; ALANY, R. Octanol Water Partition Coefficient Determination for Model Steroids Using an HPLC Method. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 5, n. 6, p. 394–400, sep 2008. ISSN 15701808. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/83246/article>>.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 3, n. 3, p. 159–175, nov 1994. ISSN 09277765. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0927776594800634>>.

SILVA, A. C. et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86, n. 1, p. 158–165, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511001822>>.

SILVA, J. O. da et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 145–52, aug 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054531>>.

SILVA, J. O. da et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, v. 50, n. 2, p. 283–91, aug 2007. ISSN 0041-0101. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517426>>.

SIMON, G. A.; MAIBACH, H. I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations—an overview. *Skin pharmacology and applied skin physiology*, v. 13, n. 5, p. 229–234, 1982. ISSN 1660-5527.

- SIVARAMAKRISHNAN, R. et al. Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterisation by paretic spectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal of Controlled Release*, v. 97, n. 3, p. 493–502, jul 2004. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904001695>>.
- SONG, J.; FAN, X.; SHEN, Q. Daidzein-loaded nanostructured lipid carriers-PLGA nanofibers for transdermal delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 501, feb 2016. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316300886>>.
- SOUTO, E. B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R. H. Polymorphic behaviour of Compritol 888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 4, p. 417–433, 2006.
- SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *International Journal of Cosmetic Science*, Blackwell Publishing Ltd, v. 30, n. 3, p. 157–165, jun 2008. ISSN 0142-5463.
- SOUZA, L. G. et al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, n. 1, p. 189–196, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641111000786>>.
- SPELLBERG, B. The cutaneous citadel. *Life Sciences*, v. 67, n. 5, p. 477–502, jun 2000. ISSN 00243205. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320500006536>>.
- STANCAMPIANO, A. H. S.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Effect of Lipophilicity of Dispersed Drugs on the Physicochemical and Technological Properties of Solid Lipid Nanoparticles. *The Open Drug Delivery Journal*, v. 2, p. 26–32, 2008.
- STANG, M.; SCHUCHMANN, H.; SCHUBERT, H. Emulsification in High-Pressure Homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, v. 1, n. 4, p. 151, oct 2001. ISSN 16180240.
- SUDHAPRIYADHARSHINI, G. Topical Glucocorticoids – A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 6, n. 6, p. 244–246, 2014.
- SUEKI, H. et al. Hairless guinea pig skin: Anatomical basis for studies of cutaneous biology. *European Journal of Dermatology*, v. 10, n. 5, p. 357–364, 2000. ISSN 11671122.
- SUFFREDINI, I. B. et al. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Die Pharmazie*, v. 61, n. 8, p. 722–4, aug 2006. ISSN 0031-7144. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964718>>.
- SÜTÖ, B. et al. Development of ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier-based gels : characterization and investigation of in vitro and in vivo penetration through the skin. *International Journal of Nanomedicine*, v. 11, p. 1201–1212, 2016. ISSN 11782013.
- SWEETMAN, S. C. *Martindale: the complete drug reference*. [S.l.]: Pharmaceutical press, 2009. ISBN 0853698406.
- TADROS, T. F. *Emulsion Science and Technology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2009. 1–326 p. ISBN 9783527325252.

- TAKEMOTO, E. et al. Composição química da semente e do óleo de baru (*Ddipteryx alata* Vog) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 60, n. 2, p. 113–117, 2001. ISSN 0073-9855. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis{&}src=google{&}base=LILACS{&}lang=p{&}nextAction=lnk{&}exprSearch=339396>>.
- TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 19, n. 29-43, p. 29–43, jul 2013. ISSN 14668564.
- TAMJIDI, F. et al. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 26, p. 366–374, dec 2014. ISSN 14668564. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856414001076>>.
- TAN, C. et al. Properties of An Oral Nanoformulation of A Molecularly Dispersed Amphotericin B Comprising A Composite Matrix of Theobroma Oil and Bee'S Wax. *Nanomaterials*, v. 4, n. 4, p. 905–916, dec 2014. ISSN 2079-4991. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4991/4/4/905/htm>>.
- TAS, Ç. et al. In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Farmaco*, v. 58, n. 8, p. 605–611, 2003. ISSN 0014827X.
- TAYLOR, M. *Stabilisation of water-in-oil emulsions to improve the emollient properties of lipstick*. 127 p. Tese (Tese de Doutorado) — University of Birmingham, 2011. Disponível em: <<http://etheses.bham.ac.uk/1675/>>.
- TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of controlled release*, v. 128, n. 2, p. 134–41, jun 2008. ISSN 1873-4995.
- TEIXEIRA, R. d. S. et al. Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acid constituents of Amazonian native flora oils. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 3, p. 399–404, 2012.
- TEJA, V.; CHOWDARY, V.; RAJU, Y. A glimpse on solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 2, p. 1649–1657, 2014. Disponível em: <<http://www.jgtps.com/admin/uploads/SIDvqX.pdf>>.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 338–350, apr 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0100-40422006000200026{&}lng=en{&}nrm>.
- TETKO, I. V. et al. Virtual computational chemistry laboratory—design and description. *Journal of computer-aided molecular design*, v. 19, n. 6, p. 453–63, jun 2005. ISSN 0920-654X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231203>>.
- THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. V. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. [S.l.]: CRC Press, 2007. 376 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). ISBN 9781420008449.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical Methods*, v. 1, n. 1, p. 25, 2010. ISSN 2229-4708. Disponível em: <<http://www.phmethods.net/article/700>>.

TOKTON, N.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Development of ellagic acid rich pomegranate peel extract loaded nanostructured lipid carriers (NLCS). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 4, p. 259–265, 2014. Disponível em: <<http://www.ijppsjournal.com/Vol6Issue4/9010.pdf>>.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin pharmacology and physiology*, v. 19, n. 2, p. 106–21, may 2006. ISSN 1660-5527. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685150>>.

TUNG, N.-T.; HUYEN, V.-T.; CHI, S.-C. Topical delivery of dexamethasone acetate from hydrogel containing nanostructured liquid carriers and the drug. *Archives of pharmacal research*, v. 38, n. 11, p. 1999–2007, 2015. ISSN 0253-6269. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940221>>.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die Pharmazie*, v. 61, n. 5, p. 375–86, may 2006. ISSN 0031-7144. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724531>>.

UNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International journal of nanomedicine*, v. 2, n. 3, p. 289–300, jan 2007. ISSN 1176-9114. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676658&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 311–322, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098713001218>>.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, SBQ, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500034&lng=en&nrm>.

VALIVETI, S. et al. In vitro/in vivo correlation studies for transdermal delta 8-THC development. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 93, n. 5, p. 1154–64, 2004. ISSN 0022-3549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067692>>.

VANDENBURG, L. E.; WILDER, E. A. The structural constituents of carnauba wax. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 47, n. 12, p. 514–518, dec 1970. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02639240>>.

VENKATESWARLU, V.; MANJUNATH, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of controlled release*, v. 95, n. 3, p. 627–38, mar 2004. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.005>>.

VERDIER-SÉVRAIN, S.; BONTÉ, F. Skin hydration: A review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 6, n. 2, p. 75–82, 2007. ISSN 14732130.

VIANA, F.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoid saponins from stem bark of *Pentaclethra macroloba*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, n. 4, p. 595–602, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532004000400024>>.

VIANA, F. A. et al. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments for two new monodesmoside saponins from *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze. *Magnetic resonance in chemistry*, v. 42, n. 8, p. 695–9, aug 2004. ISSN 0749-1581. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15248257>>.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 60, n. 1, p. 113–22, may 2005. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848063>>.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physical stability, centrifugation tests, and entrapment efficiency studies of carnauba wax-decyl oleate nanoparticles used for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 63, n. 2, p. 115–27, jun 2006. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621487>>.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: the synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. *International journal of pharmaceuticals*, v. 322, n. 1-2, p. 161–70, sep 2006. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306004212>>.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. In vitro erythematous UV-A protection factors of inorganic sunscreens distributed in aqueous media using carnauba wax-decyl oleate nanoparticles. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 65, n. 1, p. 122–5, jan 2007. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971098>>.

VIVEK, K.; REDDY, H.; MURTHY, R. S. R. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, v. 8, n. 4, p. E83, 2007.

WANG, X. et al. Dose-dependent sustained release of dexamethasone in inner ear cochlear fluids using a novel local delivery approach. *Audiology & neuro-otology*, v. 14, n. 6, p. 393–401, jan 2009. ISSN 1421-9700. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923809>>.

WEBER, L. *JChem Base-ChemAxon*. [S.l.]: ROYAL SOC CHEMISTRY THOMAS GRAHAM HOUSE, 2008. 65–66 p.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, v. 68, n. 3, p. 453–66, mar 2008. ISSN 0939-6411. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107002901>>.

- WILHELM, K.-P.; FREITAG, G.; WOLFF, H. H. Surfactant-induced skin irritation and skin repair. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 30, n. 6, p. 944–949, jun 1994. ISSN 01909622. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962294701148>>.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier B.V., v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012. ISSN 0169409X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>>.
- WILLIAMSON, G. B.; COSTA, F. Dispersal of Amazonian Trees: Hydrochory in *Pentaclethra macroloda*. *Biotropica*, v. 32, n. 3, p. 548–552, sep 2000. ISSN 0006-3606.
- WISSING, S.; LIPPACHER, a.; MÜLLER, R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of cosmetic science*, v. 52, n. 5, p. 313–324, 2001. ISSN 1525-7886.
- WISSING, S. A.; MÄDER, K.; MÜLLER, R. H. Prolonged efficacy of the insect repellent lemon oil by incorporation into solid lipid nanoparticles (SLN™). In: *Third World Meeting APGI/APV*. [S.l.: s.n.], 2000. p. 439–440.
- WISSING, S. A.; MÄDER, K.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) as a novel carrier system offering prolonged release of the perfume Allure (Chanel). In: *Proc. Int. Symp. Control Rel Bioact Mater.* [S.l.: s.n.], 2000. v. 27, p. 311–312.
- XU, X. et al. Anti-inflammatory activity of injectable dexamethasone acetate-loaded nanostructured lipid carriers. *Drug delivery*, v. 18, n. 7, p. 485–92, oct 2011. ISSN 1521-0464. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2011.589087>>.
- YADAV, N. et al. Solid lipid nanoparticles - a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 5, n. 2, p. 8–18, 2013.
- YADAV, P. et al. Development and characterization of solid lipid nanoparticles by solvent diffusion-evaporation method for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 5, n. 3, p. 1028–1034, 2014. Disponível em: <<http://www.ijpsr.com/V5I3/47Vol.5,Issue3,March2014,IJPSR-3078,Paper47.pdf>>.
- YALKOWSKY, S. H.; DANNENFELSER, R. M. Aquasol database of aqueous solubility. *College of Pharmacy, University of Arizona, Tucson, AZ*, 1992.
- YANG, R. et al. The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 37, n. 2, p. 139–48, feb 2011. ISSN 1520-5762. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/03639045.2010.497151>>.
- YAZIKSIZ-ISCAN, Y. et al. Different production methods for solid lipid nanoparticles (SLN) containing the insect repellent DEET. In: *The 4th World Meeting Pharmacy, Biopharmacy and Pharmaceutical Technology, Florenz*. [S.l.: s.n.], 2002.
- YILMAZ, N. Temperature-dependent viscosity correlations of vegetable oils and biofuel-diesel mixtures. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p. 2936–2938, 2011. ISSN 09619534.

- YOON, G.; PARK, J. W.; YOON, I.-S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, aug 2013. ISSN 2093-5552. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40005-013-0087-y>>.
- YU, L. X. et al. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharmaceutical Research*, Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, v. 19, n. 7, p. 921–925, 2002. ISSN 1573-904X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1016473601633>>.
- ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of Controlled Release*, Elsevier B.V., v. 193, p. 90–99, jun 2014. ISSN 18734995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914003666>>.
- ZHANG, N. et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 327, n. 1-2, p. 153–9, dec 2006. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.026>>.
- ZHANG, T. et al. Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 3, p. 174–179, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871100100X>>.
- ZHENG, K. et al. The effect of polymer–surfactant emulsifying agent on the formation and stability of α -lipoic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC). *Food Hydrocolloids*, v. 32, n. 1, p. 72–78, jul 2013. ISSN 0268005X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12002585>>.
- ZHUANG, C.-Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier B.V., v. 394, n. 1-2, p. 179–85, jul 2010. ISSN 1873-3476. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471464>>.

Apêndices

APÊNDICE A – Análise estatística da diferença de concentração de DXM no EC
entre os as formulações avaliadas

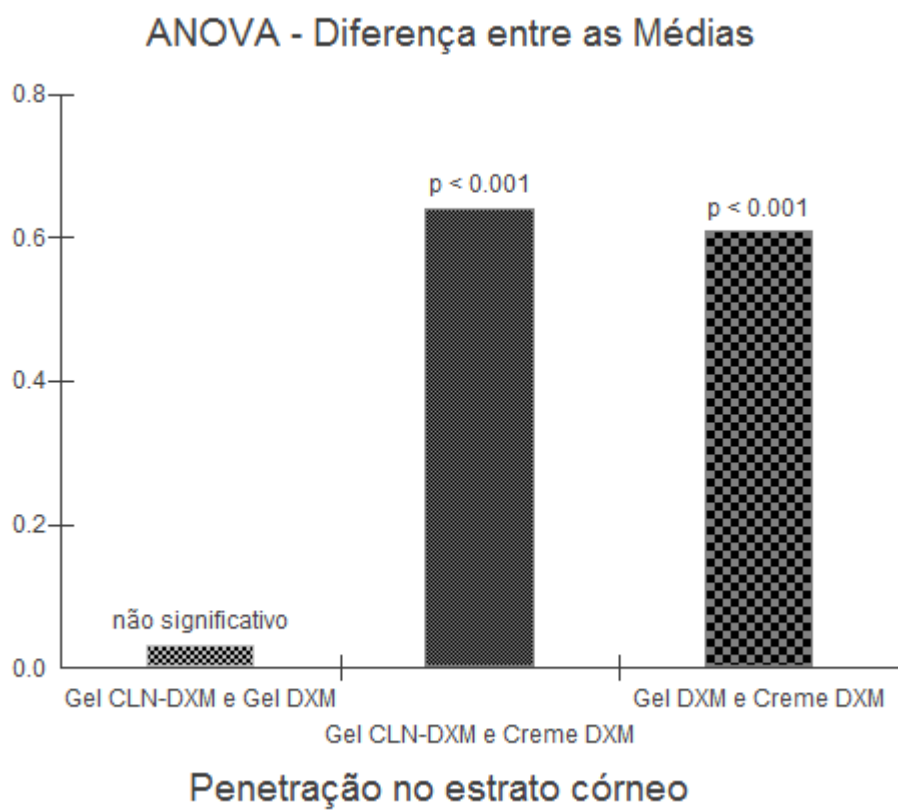
Tabela 42 – Teste ANOVA um critério (penetração de DXM no EC) seguido de teste *t* entre os grupos avaliados.

Fontes de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Média dos quadrados (QM)
Tratamentos	2	1,449	0,724
Erro	13	0,181	0,014
F =	51,9102	—	—
(<i>p</i>) =	< 0.0001	—	—
Média (Gel CLN-DXM) =	0,8050	—	—
Média (Gel DXM) =	0,7733	—	—
Média (Creme DXM) =	0,1650	—	—
Teste <i>t</i> :	Diferença	<i>t</i>	(<i>p</i>)
Médias (Gel CLN-DXM e Gel DXM) =	0,0317	0,4153	NS
Médias (Gel CLN-DXM e Creme DXM) =	0,6400	8,3937	< 0,001
Médias (Gel DXM e Creme DXM) =	0,6083	8,9201	< 0,001

Nota: NS = não significativo

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 47 – Representação gráfica do teste ANOVA seguido pelo teste *t* da diferença entre as médias de concentração de DXM retidas no estrato córneo das formulações avaliadas.



Fonte: produzido pelo autor.

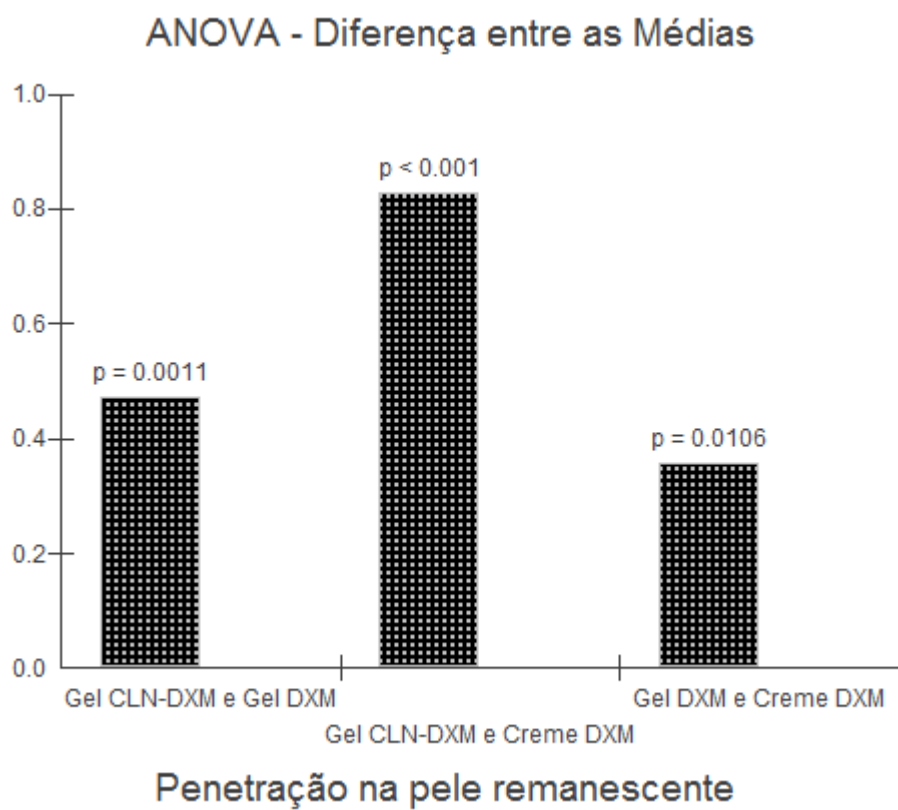
APÊNDICE B – Análise estatística da diferença de concentração de DXM na pele remanescente entre os as formulações avaliadas

Tabela 43 – Teste ANOVA um critério (penetração de DXM na pele remanescente) seguido de teste t entre os grupos avaliados.

Fontes de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Média dos quadrados (QM)
Tratamentos	2	1,217	0,609
Erro	10	0,259	0,026
F =	23,4847	—	—
(p) =	0,0003	—	—
Média (Gel CLN-DXM) =	0,9675	—	—
Média (Gel DXM) =	0,4967	—	—
Média (Creme DXM) =	0,1400	—	—
<hr/>			
Teste t :	Diferença	t	(p)
<hr/>			
Médias (Gel CLN-DXM e Gel DXM) =	0,4708	4,5305	0.0011
<hr/>			
Médias (Gel CLN-DXM e Creme DXM) =	0,8275	6,7295	< 0.001
<hr/>			
Médias (Gel DXM e Creme DXM) =	0,3567	3,1329	0.0106

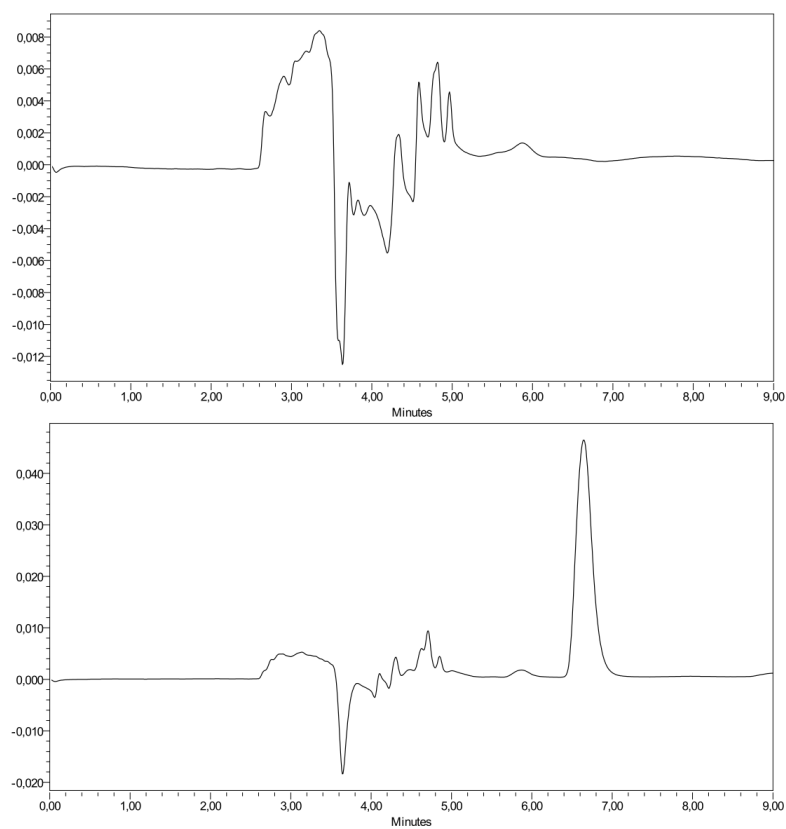
Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 48 – Representação gráfica do teste ANOVA seguido pelo teste *t* da diferença entre as médias de concentração de DXM retidas na pele remanescente das formulações avaliadas.

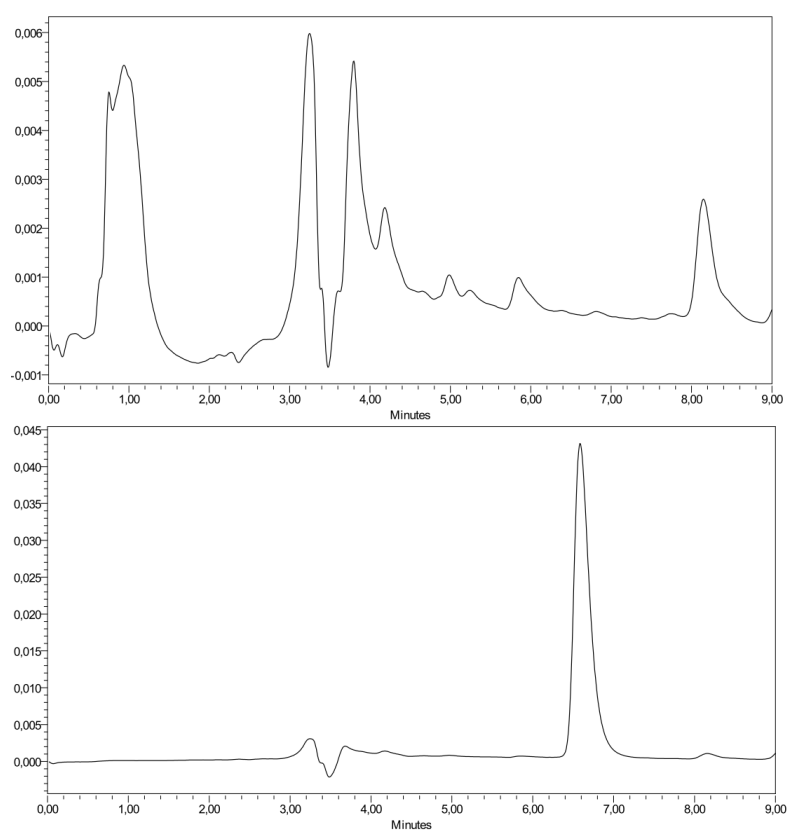


Fonte: produzido pelo autor.

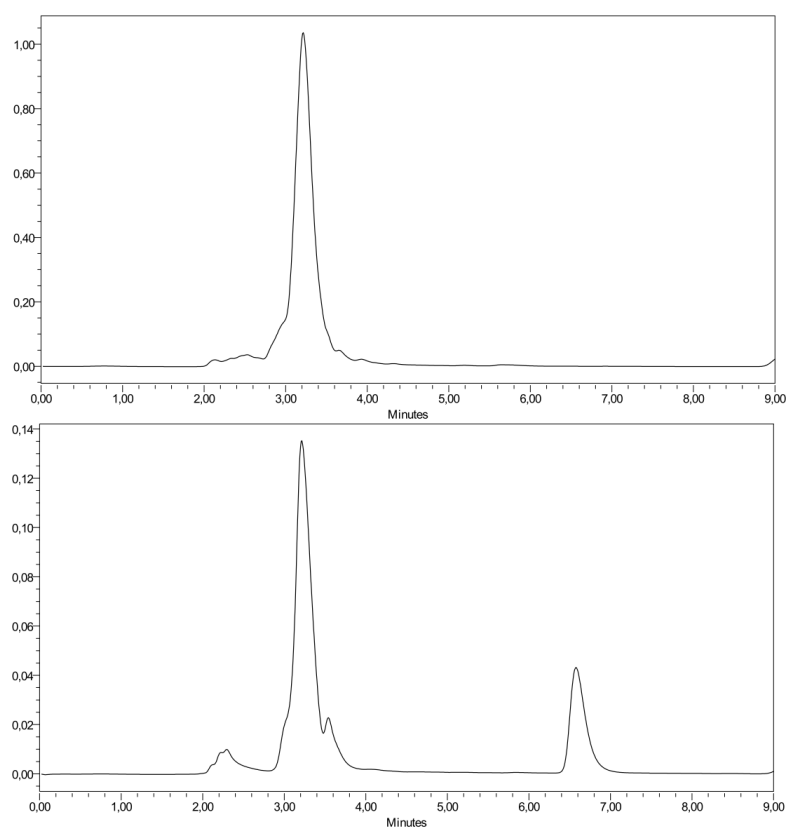
APÊNDICE C – Cromatogramas referentes à avaliação da seletividade

Figura 49 – Cromatogramas obtidos de amostras de CLN branco e CLN contaminado (*spiked*) com DXM.

Fonte: produzido pelo autor.

Figura 50 – Cromatogramas obtidos de amostras de EC branco e EC contaminado (*spiked*) com DXM.

Fonte: produzido pelo autor.

Figura 51 – Cromatogramas obtidos de amostras de pele branco e pele contaminada (*spiked*) com DXM.

Fonte: produzido pelo autor.