

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados:
produção, caracterização, dermatofarmacocinética e avaliação
farmacodinâmica em modelo animal de dor neuropática periférica**

RICARDO LORENZONI

Porto Alegre, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados:
produção, caracterização, dermatofarmacocinética e avaliação
farmacodinâmica em modelo animal de dor neuropática periférica**

Tese apresentada por **Ricardo Lorenzoni**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2017.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31/03/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª Drª Sandra Elisa Hass
Universidade Federal do Pampa

Profª Drª Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Drª Stela Maris Kuze Rates
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Wolnei Caumo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lorenzoni, Ricardo

Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados: produção, caracterização, dermatofarmacocinética e avaliação farmacodinâmica em modelo animal de dor neuropática periférica /

Ricardo Lorenzoni. -- 2017.

180 f.

Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Coorientador: Teresa Dalla Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Nanocápsulas poliméricas. 2. Farmacocinética. 3. Microdiálise. 4. Farmacodinâmica. I. Guterres, Silvia Stanisçuaski, orient. II. Costa, Teresa Dalla, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para administração de fármacos e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e no Laboratório de Farmacologia Experimental do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com financiamento da CAPES/do CNPq/ e da FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Esta tese é dedicada aos meus pais Paulo Roberto Lorenzoni e Dorotéa Schaeffer que sempre me deram o apoio necessário para continuar. Da mesma maneira a meu irmão mais velho Eduardo Lorenzoni, cujo relacionamento, conversas e força foram fundamentais ao longo desse tempo. Os méritos são todos de vocês, as conquistas obtidas aconteceram porque vocês me deram esta oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Meu enorme agradecimento a minha mãe Dorotéa Schaeffer, a meu pai Paulo Roberto Lorenzoni que me apoiaram, incentivaram e tiveram muita paciência em todos os momentos.

A meu irmão Eduardo Lorenzoni pela amizade, afeto, companheirismo e confiança, relação que nos fortalece a cada dia.

A minha tia Salete Schaeffer do Amaral e tio Paulo de Tarso Lorenzoni do Amaral e as minhas primas Camila e Carolina que me receberam em sua casa, anos atrás, começando a descrever minha trajetória acadêmica.

As minhas Professoras orientadora e co-orientadora Dr^a. Silvia Guterres e Dr^a. Teresa Dalla Costa que além de me concederem a oportunidade, também me apoiaram, me instruíram e, fundamentalmente, souberam trabalhar com meus momentos de frustração e ansiedade durante a pesquisa.

Ao Dr. Fabiano Barreto, cuja colaboração e prestatividade fora incansável e louvável na análise das amostras por LC-MS/MS.

A Dr^a. Bibiana Araújo pelo auxílio na resolução dos problemas de calibração das sondas de microdiálise.

A Professora Dr^a. Ana Maria Miranda e ao Cleverton Freitas de Lima que me receberam na UFRJ e auxiliaram significativamente nos experimentos de efeito terapêutico.

Aos amigos do laboratório 405, que no decorrer do tempo foram se ampliando, em especial ao amigo João Guilherme B. De Marchi, que foi a pessoa que melhor me recebeu quando da minha chegada.

Aos amigos do centro bioanalítico de medicamentos, que além de me receberem de braços abertos em todos os momentos, auxiliaram de sobremaneira a execução dos experimentos de microdiálise. Com destaque

aos queridos Bruna Torres, Carolina Miranda, Fernando Carreño e Izabel Almeida Alves.

Aos meus antigos "IC's" de Santa Maria, hoje grandes amigos e colegas de doutorado Samuel Davies e Letícia M. Cordenonsi é indescritível o carinho e consideração que tenho por vocês.

As famílias de amigos de Santo Augusto e que moram aqui em Porto Alegre e foram fundamentais durante este período. Com destaque ao Felipe, Bianca e Ágata Duarte e ao João, Liliane e Caetano Burin.

A turma de amigos dos "Falcas" que levam consigo minhas histórias e eu levo deles todo amor que uma verdadeira amizade pode carregar.

A amiga que me acompanhou desde o mestrado, Michelli Barcelos Antonow, cuja parceria, amizade e risos são marcantes e únicos.

Enfim, a todos que de certa forma contribuíram de alguma maneira na execução deste trabalho ou me acompanharam pessoalmente durante o doutorado.

RESUMO

Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados: produção, caracterização, microdiálise dérmica e avaliação farmacodinâmica em modelo animal de dor neuropática periférica

A dor neuropática periférica (DNP) é uma doença complexa, cujo tratamento com creme comercial contendo capsaicinóides (capsaicina – CAPS e dihidrocapsaicina – D-CAPS) é pouco efetivo e causa efeitos adversos significativos, como dor em queimação e eritema. Nos últimos anos as nanocápsulas poliméricas (NC) têm sido estudadas para melhorar o efeito terapêutico de fármacos e reduzir seus efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados (HQNC_{Caps}); comparar seu efeito terapêutico com hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides dissolvidos em solução etanólica (HQET_{Caps}) e com creme comercial de referência no mercado farmacêutico, frente a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em camundongos suíços modelo de DNP; e, avaliar o perfil de concentração livre dos capsaicinóides na derme de ratos *Wistar*, local de grande concentração de nociceptores, utilizando a técnica de microdiálise dérmica, quando aplicado a partir das formulações HQNC_{Caps}, HQET_{Caps} e Creme comercial. As suspensões de nanocápsulas foram produzidas por meio da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado. As suspensões apresentaram tamanho médio de partícula homogêneo (156 ± 6 nm), com baixo índice de polidispersão (0,08), potencial zeta positivo ($11,2 \pm 3,5$ mV), pH levemente ácido ($6,1 \pm 0,1$) e alta eficiência de encapsulação da CAPS e da D-CAPS ($\cong 100\%$), considerando a concentração de 1,3 mg/mL de capsaicinóides na formulação (0,78 mg/mL de CAPS e 0,39 mg/mL de D-CAPS). O HQNC_{Caps} produzido com estas suspensões mostrou concentração próxima a do HQET_{Caps} e do creme comercial (1,16 mg/g; 1,17 mg/g e 1,19 mg/g, respectivamente), apresentando estruturas nanométricas em sua composição, pH levemente ácido ($4,73 \pm 0,08$), valor de consistência de 20,38 Pa.sⁿ, característica de sistema não-newtoniano, com índice de fluxo de 0,70 e comportamento pseudoplástico, modelado matematicamente segundo equação de Ostwald, mostrando características adequadas para aplicação via tópica. A

avaliação terapêutica foi dividida em protocolo 1 e 2. No protocolo 1 avaliou-se o efeito terapêutico no tempo 1h 3h, 6h, 24h 48h e 96h após o início do tratamento dos camundongos (modelo de DNP), analisando o efeito antinociceptivo das formulações ao aplicar 50mg de formulação/dia na superfície plantar da pata dos animais, cuja neuropatia foi induzida através da ligação parcial do nervo ciático. No protocolo 2, avaliou-se a manutenção do efeito terapêutico após a interrupção do tratamento dos animais. No protocolo farmacodinâmico 1, o HQNC_{Caps} foi a única formulação que apresentou efeito antialodínico e antihiperalgésico 6h após o início do tratamento dos animais e manteve esta ação até 96h. O HQET_{Caps} e o creme comercial apresentaram efeito antihiperalgésico apenas em 48h e 96h após o início do tratamento; e o efeito antialodínico para o creme comercial ocorreu após 48h do início do tratamento e em 96h para o HQET_{Caps}. No protocolo 2, o HQNC_{Caps} e o creme comercial mantiveram sua atividade antinociceptiva frente a hiperalgisia térmica por 6 dias após a interrupção do tratamento. Já frente a alodínia, o efeito antinociceptivo foi mantido 48h após a interrupção do tratamento apenas para o HQNC_{Caps}, enquanto que o creme comercial não mostrou manutenção deste efeito antinociceptivo. Os experimentos de microdiálise dérmica realizados após a aplicação de 50mg de cada formulação/cm² de pele na região abdominal dos ratos *Wistar*, durante 12h, revelaram um aumento de 1,6 a concentração de CAPS, D-CAPS e soma de capsaicinóides livre quando o fármaco é administrado a partir da formulação HQNC_{Caps} e comparado com a formulação HQET_{Caps} e creme comercial, respectivamente, resultados que podem estar relacionados com o melhor efeito terapêutico da formulação HQNC_{Caps}. Conclui-se que o HQNC_{Caps} se mostra como uma potencial formulação para melhorar o tratamento da DNP.

PALAVRAS CHAVE: nanocápsulas; dor neuropática, capsaicinóides, farmacocinética, microdiálise dérmica.

ABSTRACT

Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: production, characterization, dermal microdialysis and pharmacodynamic assessment in animal model of peripheral neuropathic pain

The peripheral neuropathic pain (PNP) is a complex disease, being the treatment with creams containing capsaicinoids (capsaicin – CAPS and dihydrocapsaicin – D-CAPS) low effective and causing several side effects, as burning pain and erythema. In the last years polymeric nanocapsules (NC) has been studied for improving the therapeutic effect of drugs and reducing the side effects. This study aimed to produce and characterize chitosan hydrogel containing nanocapsules loaded capsaicinoids (CHNC_{Caps}); comparing their therapeutic effect with that of chitosan hydrogel containing capsaicinoids dispersed in a hydroalcoholic solution (CHET_{Caps}) and commercial cream (Cream) used as reference in pharmaceutical market, assessing the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in swiss mice model of PNP; and assessment the free concentration capsaicinoids using dermal microdialysis in *Wistar* rats, site of high concentration of nociceptors, when administered by CHNC_{Caps}, CHET_{Caps} and Cream. The nanocapsule suspensions showed average particle size reduced and homogeneous (156 ± 6 nm), with low polydispersity index (0.08), indicating unimodal size distribution, positive zeta potential (11.2 ± 3.5 mV), slightly acid pH (6.1 ± 0.1) and high encapsulation efficiency of capsaicinoids (near 100%), considering the concentration 1.3 mg/mL of capsaicinoids in formulation. The hydrogel produced with suspensions showed capsaicinoids concentration near of commercial cream (1.16 and 1.17 mg/g, respectively) and the structure of nanocapsules was not affected by their incorporation in the hydrogel. The pH value was slightly acid (4.73 ± 0.08), the consistency value was 20,38 Pa.sⁿ, typical of a non-Newtonian system, with 0.70 flow index denoting pseudoplastic behavior mathematically modeled follow Ostwald equation, showing characteristics suitable for topical application. The therapeutic assessment was divided into protocol 1 and 2. In protocol 1 the therapeutic effect was evaluated 1h 3h, 6h, 24h 48h e 96h after the beginning of treatment (DNP model), analyzing the antinociceptive effect of formulations when

administrated 50mg formulation / day to the plantar surface of the left foot of each mice whose neuropathy was induced by partial sciatic ligation model. In protocol 2, the maintenance of the therapeutic effect after the treatment interruption was evaluated. In pharmacodynamic protocol 1, the CHNC_{Caps} was the only formulation that showed antiallodynic and antihyperalgesic effects 6h after the beginning of treatment, maintaining these effects until 96h. The CHET_{Caps} and the commercial cream showed antihyperalgesic effect only in 48h and 96h after the beginning of treatment; the anti-allodynic effect for the commercial cream occurred after 48 hours from the beginning of treatment and at 96 hours for CHET_{Caps}. In protocol 2, the CHNC_{Caps} and the commercial cream maintained the antinociceptive activity for 6 days after the treatment interruption. For allodynia, the antinociceptive effect was maintained 48h after interruption of treatment only for CHNC_{Caps}, whereas the commercial cream did not maintain the antinociceptive effect. The microdialysis experiments performed after the application 50mg each formulation/cm² on abdominal skin of rats, for 12 h, showed an increase of 1.6 folds free CAPS, D-CAPS and capsaicinoid sum when this substance was administered from HQNC_{Caps} formulation and compared with HQET_{Caps} formulation and commercial cream, respectively. These results may be related with the best therapeutic effect of the formulation HQNC_{Caps}. We conclude that HQNC_{Caps} is a promising formulation for treatment of PNP.

KEY WORDS: nanocapsules, neuropathic pain, capsaicinoids, pharmacokinetics, dermal microdialysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da (a) capsaicina e da (b) dihidrocapsaicina.	48
Figura 2. Princípio da microdiálise.	61
Figura 3. Esquema representando o protocolo 1 dos experimentos farmacodinâmicos.	74
Figura 4. Esquema representando o protocolo 2 dos experimentos farmacodinâmicos.	74
Figura 5. Esquema do protocolo experimental dos experimentos farmacocinéticos.	87
Figura 6. Representação da inserção das sondas e do experimento de microdiálise dérmica.	87
Figura 7. Gráfico radar e caracterização das partículas.	93
Figura 8. Tamanho médio de partícula por volume avaliado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.	96
Figura 9. Potencial zeta das partículas determinados pela técnica de eletroforese.	96
Figura 10. Tamanho médio de partícula do HQNC _{Caps} avaliado por volume pela técnica de difração de laser.	101
Figura 11. Tamanho médio de partícula HQNC _{Caps} avaliado por número pela técnica de difração de laser.	101
Figura 12. Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento das formulações semissólidas.	103
Figura 13. Efeito dos diferentes tratamentos sobre a variação do tempo de latência de retirada de pata dos animais após estímulo radiante térmico.	106
Figura 14. Efeito dos diferentes tratamentos sobre o limiar de retirada de pata dos animais após estímulo mecânico.	110
Figura 15. Efeito frente a hiperalgesia térmica após interrupção do tratamento dos animais.	113
Figura 16. Efeito frente a alodínia mecânica após interrupção do tratamento dos animais.	115
Figura 17. Cromatogramas referentes à injeção de amostras com e sem fármaco.	117

Figura 18. Distribuição dos resíduos vs. concentração obtida no ensaio inter-dia da validação da técnica analítica.....	118
Figura 19. Erro relativo percentual em função da concentração de fármaco utilizada.	120
Figura 20. Curva analítica obtida utilizando concentração vs área de pico para a Capsaicina e Dihidrocapsaicina.	122
Figura 21. Efeito da concentração da capsaicina e da dihidrocapsaicina na recuperação aparente por diálise e retrodiálise.....	126
Figura 22. Influência do fluxo de perfusão na recuperação relativa da capsaicina e da dihidrocapsaicina.....	126
Figura 23. Recuperação aparente (R_{app}) in vitro da dihidrocapsaicina determinada experimentalmente pelo método de diálise e valores modelados pela Eq. (7).....	128
Figura 24. Concentração total de capsaicinóides na pele dos animais após o experimento de microdiálise.....	130
Figura 25. Fotomicrografia da pele onde foi inserida a sonda de microdiálise.	131
Figura 26. Concentração de capsaicina; da dihidrocapsaicina e do somatório dos capsaidinóides livres em função do tempo, ao longo do experimento de microdiálise.	132
Figura 27. Valores de área sob a curva de 0-12h para o experimento de microdiálise dérmica representado por gráfico de barras.....	135
Figura 28. Cromatograma da diluição e dissolução das NC _B	173
Figura 29. Cromatograma da capsaicina e dihidrocapsaicina pelo método de HPLC-UV.....	174
Figura 30. Representação gráfica da média das curvas-padrão da capsaicina no ensaio de linearidade.	174
Figura 31. Representação gráfica da média das curvas padrão da dihidrocapsaicina no ensaio de linearidade.....	174
Figura 32. Cromatograma da diluição e dissolução dos HQNC _B	176
Figura 33. Cromatograma referente às amostras de hidrogel composto por suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides.....	176
Figura 34. Cromatograma de amostras de pele sem fármaco.	177

Figura 35. Cromatograma referente às amostras de pele contendo capsaicinóides..... 177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos hidrogéis (HQNC _{Caps} , HQNC _B e HQET _{Caps}).	69
Tabela 2. Grupos de animais experimentais e tratamentos que foram utilizados através da via tópica.	73
Tabela 3. Parâmetros otimizados do sistema LC/MS-MS e as transições monitoradas no modo monitoramento de reações múltiplas da Capsaicina e dihidrocapsaidina.	78
Tabela 4. Diâmetro médio de partícula obtido utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico.	96
Tabela 5. Teste de homogeneidade de variância.	119
Tabela 6. Parâmetros de regressão da reta de calibração na validação da metodologia analítica via LC-MS/MS	121
Tabela 7. Precisão intra e inter-dia e exatidão para determinação da capsaicina.	123
Tabela 8. Precisão intra e inter-dia e exatidão para determinação da dihidrocapsaicina.	123
Tabela 9. Estabilidade das amostras em solução de Ringer.	124
Tabela 10. Resultados do experimento de ligação da dihidrocapsaicina na tubulação sondas.	127
Tabela 11. Parâmetros dermatofarmacocinéticos calculados através de análise não compartimental para capsaicina e dihidrocapsaicina	134

LISTA DE EQUAÇÕES

Eq. 1 Cálculo do Span, que demonstra o índice de dispersão das partículas..	66
Eq. 2. Variação do tempo de latência de retirada de pata.....	75
Eq. 3 Recuperação aparente por retrodiálise.....	83
Eq. 4 Recuperação aparente por diálise.	83
Eq. 5 Ligação da D-CAPS a tubulação da sonda.....	83
Eq. 6 Coeficiente de ligação da D-CAPS a sonda de microdiálise.....	84
Eq. 7 Recuperação aparente da D-CAPS.	84
Eq. 8. Recuperação aparente por retrodiálise <i>in vivo</i>	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
3.1 Fisiologia da dor	39
3.2 Dor Neuropática periférica (DNP)	41
3.3 Tratamentos para a DNP	44
3.4 Capsaicinóides	47
3.5 Nanopartículas poliméricas	51
3.6 Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados (HQNC _{Caps})	53
3.7 Modelo Animal de DNP	57
3.8 Microdiálise	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 Materiais	65
4.2 Produção das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides	65
4.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas	65
4.3.1 Determinação do diâmetro e distribuição dos tamanhos de partícula pela técnica de difração de laser	65
4.3.2 Determinação do diâmetro e distribuição do tamanho de partícula pela técnica de espalhamento de luz dinâmico	66
4.3.3 Determinação do potencial zeta	66
4.3.4 Determinação do pH das suspensões	66
4.3.5 Teor dos capsaicinóides nas suspensões de nanocápsulas	67
4.3.6 Estabilidade das suspensões de nanocápsulas	67
4.3.7 Avaliação da presença de nanocristais	68
4.3.8 Eficiência de encapsulação	68
4.4. Preparação das formulações semissólidas	68

4.4.1	Preparação dos hidrogéis de quitosana produzido com suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo ou não capsaicinóides	68
4.4.2	Preparação dos hidrogéis de quitosana composto com solução etanólica contendo capsaicinóides	69
4.5	Caracterização físico-química das formulações semissólidas	70
4.5.1	Determinação do pH	70
4.5.2	Diâmetro de partícula	70
4.5.3	Viscosidade	70
4.5.4	Doseamento dos capsaicinóides	71
4.6	Protocolos de pesquisa in vivo	71
4.6.1	Aspectos éticos dos experimentos farmacodinâmicos	71
4.6.2	Delineamento dos experimentos farmacodinâmicos	72
4.6.2.1	Protocolo indutor de dor neuropatia – modelo de ligação parcial do nervo ciático	74
4.6.2.1.1	Avaliação da hiperalgesia térmica	75
4.6.2.1.2	Avaliação da alodínia mecânica	75
4.6.2.2	Análise estatística dos experimentos farmacodinâmicos	76
4.6.3	Metodologia Bioanalítica para Experimentos de Microdiálise Dérmica ...	76
4.6.3.1	Equipamento	76
4.6.3.2	Método	76
4.6.3.3	Preparação da solução primária de capsaicina e dihidrocapsaicina ...	77
4.6.3.4	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	77
4.6.3.5	Validação do método bioanalítico.....	78
4.6.3.5.1	Seletividade e efeito residual.....	78
4.6.3.5.2	Linearidade.....	78
4.6.3.5.3	Precisão e exatidão	79
4.6.3.5.4	Teste de estabilidade	80
4.6.4	Concentração total de capsaicinóides na pele dos animais e experimentos de microdiálise dérmica.....	80
4.6.4.1	Aspectos Éticos dos experimentos farmacocinéticos	80
4.6.4.2	Concentração total dos capsaicinóides na pele dos ratos Wistar no final do experimento de microdiálise dérmica	81
4.6.4.3	Sistema de microdiálise dérmica.....	81
4.6.4.3.1	Calibração in vitro das sondas de microdiálise.....	82

4.6.4.3.1.1 Influência do fluxo de perfusão e concentração de CAPS e D-CAPS na recuperação in vitro dos fármacos	82
4.6.4.3.1.2 Experimentos de ligação da D-CAPS na tubulação das sondas de microdiálise	83
4.6.4.3.1.1 Determinação do coeficiente de difusão de transferência de massa em diferentes taxas de fluxo.....	84
4.6.4.3.2 Calibração in vivo das sondas de microdiálise	85
4.6.4.4 Estudo de microdiálise dérmica e determinação de parâmetros dermatofarmacocinéticos	85
4.6.4.4.1 Parâmetros farmacocinéticos	87
4.6.4.5 Análise histológica.....	88
4.6.4.6 Análises estatísticas.....	88
4.6.4.6.1 Análise estatística utilizada na calibração das sondas de microdiálise in vitro	88
4.6.4.6.2 Análise estatística utilizada na avaliação dos parâmetros farmacocinéticos	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 Produção das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides.....	90
5.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides	92
5.2.1 Diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação e doseamento dos capsaicinóides nas suspensões	92
5.3 Produção dos hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados	97
5.4 Caracterização dos hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados	99
5.4.1 Viscosidade, diâmetro de partícula, determinação do pH e doseamento dos capsaicinóides nos hidrogéis.....	99
5.5 Estudos farmacodinâmicos	104
5.5.1 Efeito dos tratamentos frente à hiperalgesia térmica – protocolo 1 dos experimentos farmacodinâmicos.....	104

5.5.2 Efeito dos tratamentos frente à alodínia mecânica — protocolo 1 dos experimentos farmacodinâmicos.....	108
5.5.3 Efeito frente à hiperalgesia térmica após a interrupção do tratamento – protocolo 2 dos experimentos farmacodinâmicos	113
5.5.4 Efeito frente à alodínia mecânica após a interrupção do tratamento – protocolo 2 dos experimentos farmacodinâmicos	114
5.6 Validação de metodologia bioanalítica para quantificação dos capsaicinóides em estudo de microdiálise dérmica	116
5.6.1 Seletividade e efeito residual.....	116
5.6.2 Linearidade.....	117
5.6.2.1 Teste de homoscedasticidade de variância e escolha do modelo de regressão	117
5.6.2 Precisão e exatidão	122
5.6.3 Estabilidade.....	124
5.7 Estudos de microdiálise dérmica e concentração de capsaicinóides na pele dos animais	125
5.7.1 Calibração das sondas de microdiálise (in vitro e in vivo) e estudo de ligação dos capsaicinóides a tubulação de poliimida	125
5.7.2 Concentração total de capsaicinóides na pele dos animais ao final do experimento de microdiálise dérmica	129
5.7.3 Análise histológica e inserção da sonda na derme dos animais	131
5.7.4 Estudo de microdiálise dérmica.....	131
5.8 Discussão Geral	140
6. CONCLUSÕES	145
6.1 Conclusões específicas:.....	146
6.1.1 Da produção e caracterização das formulações:	147
6.1.2 Do efeito terapêutico:	147
6.1.3 Da validação da metodologia bioanalítica:	148
6.1.4 Do ensaio de microdiálise dérmica:.....	148
6.2 Conclusão geral:	148
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
8. APÊNDICE 1	171
8.1 Validação parcial de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de CAPS e D-CAPS.....	173

8.1.2 Especificidade e quantificação dos capsaicinóides nos hidrogéis de quitosana.....	175
8.1.2 Especificidade e quantificação dos nas amostras de pele dos animais	176

1. INTRODUÇÃO

A dor é um fenômeno complexo, individual e subjetivo gerado a partir de componentes fisiológicos e psicológicos, que possui interferência sensorial, emocional e cognitiva (LOWE, 2002). Em conformidade com estes argumentos, a *International Association for the Study of Pain* (IASP), define que a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal dano. Acrescenta-se ainda, que a incapacidade ou inabilidade de indivíduos comunicarem-se verbalmente, não impede de se inferir que eles estejam sentindo dor e necessitem de um tratamento analgésico adequado (IASP, 2012).

Em relação ao tipo, a dor pode ser classificada em adaptativa e não adaptativa. A dor adaptativa auxilia na manutenção da integridade corpórea frente a estímulos agressivos, permitindo que o organismo realize defesa frente a lesões graves ou efetue a cicatrização de lesões ocorridas. Por sua vez, a dor não adaptativa ou crônica, é definida como a expressão de uma situação patológica do sistema somatosensorial e não está ligada ao estímulo nociceptivo evidente ou a uma lesão tecidual identificável (ONOFRE *et al.*, 2009). Este tipo de dor é representado pela dor neuropática periférica (DNP) ou pela dor funcional, que pode apresentar-se de forma contínua ou intermitente e é majoritariamente associada a pacientes idosos, de baixo nível socioeconômico, sexo feminino e baixo grau de escolaridade (ONOFRE *et al.*, 2009; VAN HECKE *et al.*, 2014).

A DNP pode ocorrer em vários locais do corpo, porém manifesta-se normalmente nas extremidades como pés, mãos, braços ou pernas, levando a física, psíquica e social, sofrimento e alto impacto na qualidade de vida dos pacientes (WIKLUND *et al.*, 2013). A manifestação destes problemas comportamentais pode ser comparada à condição biopsicossocial apresentada pelos indivíduos com depressão crônica, infarto recente do miocárdio e diabetes mal controlada (SMITH e TORRANCE, 2012).

A DNP é um dos tipos mais incapacitantes de dor, afeta 7 a 8% da população mundial (DE MORAES *et al.*, 2012) e pode ser ocasionada como consequência de uma patologia primária, de seus tratamentos, ou também de processos cirúrgicos (WOLF *et al.*, 2008). A DNP chega a afetar 35% dos 33 milhões de pacientes infectados pelo HIV no planeta (SIMPSON *et al.*, 2008; HADDAD *et al.*, 2015); 26% das pessoas com diabetes *mellitus* do Reino Unido

(JOHANSEN *et al.*, 2012); 20% das pessoas com câncer (BENNETT *et al.*, 2012); e de 2,6% a 10% das pessoas afetadas pelo herpes zoster (VAN *et al.*, 2014; REDA *et al.*, 2013). Estes percentuais podem ser ainda maiores, pois há dificuldade no diagnóstico de DNP, que pode ser designada como possível, provável ou definitiva, o que pode subestimar sua prevalência (VOTRUBEC e THONG, 2013; VAN *et al.*, 2014; DE MORAES *et al.*, 2012).

Os tratamentos da DNP são sintomáticos, pouco eficazes e podem requerer abordagem farmacológica, cirúrgica, física/ocupacional, psicológica e, muitas vezes, não objetivam eliminar a dor, mas no máximo aliviá-la (WOOLF e MANNION, 1999; SCHOLTEN e HARDEN, 2013). Neste sentido, a abordagem clínica multidisciplinar pode ser necessária e melhor sucedida. Esta equipe pode incluir médicos, neurologistas, anestesistas, neurocirurgiões, psiquiatras, psicólogos, conselheiros, enfermeiras e farmacêuticos (SCHOLTEN e HARDEN, 2013).

Entre os medicamentos utilizados para o tratamento da DNP pode-se citar analgésicos, anticonvulsivantes, antidepressivos tricíclicos, antiinflamatórios esteroides e não esteroides, opióides e agentes analgésicos tópicos. Esta variedade de tratamentos representa a heterogeneidade dos pacientes e os diferentes mecanismos patofisiológicos envolvidos no desenvolvimento do quadro neuropático (BACKONJA *et al.*, 2008; JAKEN, *et al.*, 2010). Todavia, as abordagens terapêuticas utilizadas, geralmente necessitam de várias administrações durante o dia e geram efeitos adversos significativos (BACKONJA *et al.*, 2008; JAKEN *et al.*, 2010).

Em meio aos tratamentos tópicos utilizados, destacam-se os cremes e adesivos transdérmicos contendo capsaicinóides, substâncias ativas que podem promover analgesia ao induzir a desfuncionalização de nociceptores periféricos (WATSON, 1994; SAWYNOK, 2003; WAGNER, POOLE e ROTH, 2013). Estes fármacos são considerados eficientes na redução da dor; no entanto, provocam efeitos adversos expressivos como sensação de queimação local, edema, eritema e pruridos, o que em um primeiro momento, pode aumentar a dor e piorar a qualidade de vida dos pacientes (ASTELLAS, 2013; DERRY *et al.*, 2013; KERN *et al.*, 2013). Assim sendo, configura-se como tema atual de pesquisa científica a busca por uma alternativa para melhorar a eficácia dos tratamentos

com os capsaicinóides ao mesmo tempo em que propicie redução de seus efeitos adversos.

Neste contexto surge o potencial da nanotecnologia farmacêutica através do uso das nanopartículas poliméricas como possibilidade para a solução desses vieses. A utilização de ativos associados às nanopartículas poliméricas, entre outros fatores, objetiva otimizar o efeito terapêutico dos fármacos, redução de seus efeitos adversos e aumento da adesão ao tratamento (MANJUNATH e VENKATESWARLU, 2005; ANDRIEUX e COUVREUR, 2013).

O termo nanopartículas poliméricas engloba as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem quali-quantitativamente entre si. As nanocápsulas são partículas nanométricas, que apresentam-se geralmente menores que 500 nm e constituem-se, basicamente, de um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica, sendo que o fármaco encapsulado pode se localizar no compartimento oleoso e/ou no sistema polimérico, ou ainda adsorvido na interface partícula/água. As nanoesferas, por sua vez, são sistemas matriciais poliméricos nos quais o fármaco fica dentro o sistema polimérico e/ou adsorvido à sua superfície (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010; HOFFMEISTER, *et al.*, 2012).

As nanocápsulas se destacam em relação às nanoesferas, pois apresentam maior eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos, menor conteúdo de polímero, auxiliam na alteração do perfil farmacocinético aparente dos fármacos encapsulados, aumentam a estabilidade físico-química das substâncias ativas e podem ser incorporadas em várias formas farmacêuticas, como por exemplo formas farmacêuticas de uso tópico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SANTOS-MAGALHÃES e MOSQUEIRA, 2010).

No contexto das formas farmacêuticas de uso tópico, destaca-se o hidrogel de quitosana formulado com suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides (HQNC_{Caps}) previamente desenvolvidos por Contri e colaboradores (2010), pertencente ao nosso grupo de pesquisa Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos da UFRGS (SNAF-UFRGS). Este hidrogel, além de possuir alta bioadesão e biocompatibilidade, também promove a liberação prolongada das substâncias nas diferentes camadas da pele, emergindo com grande potencial para uso frente à DNP (CONTRI *et al.*, 2010; 2011; 2013a; 2014).

Uma forma de avaliar a potencialidade deste hidrogel é através da realização de experimentos de farmacodinâmica e farmacocinética. A farmacodinâmica pode ser avaliada através de modelos animais de DNP; e para a avaliação farmacocinética, tem se destacado o uso da microdiálise dermica, que verifica a concentração de fármaco livre que atinge o local de ação desejado (JOSHI *et al.*, 2014). Assim, é nessa assertiva que amparamos a proposta desta investigação científica, que busca verificar os efeitos terapêuticos e avaliar a concentração de capsaicinóides livre (não ligado a proteínas) na derme, utilizando a técnica de microdiálise, quando os fármacos são formulados em suspensões de nanocápsulas poliméricas utilizadas na produção de hidrogel de quitosana, comparando-o com o creme comercial de referência do mercado farmacêutico e hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides dissolvidos em solução etanólica. Procedendo assim, pode-se, em hipótese, verificar a otimização do efeito medicamentoso dos fármacos quando compõem a estrutura das suspensões de nanocápsulas poliméricas que constituem o hidrogel supracitado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides (capsaicina e dihidrocapsaicina) nanoencapsulados, verificar o efeito terapêutico dessa formulação durante e após a interrupção do tratamento de camundongos suíços modelo de dor neuropática periférica, assim como avaliar a exposição dérmica dos capsaicinóides por meio da técnica de microdiálise dérmica em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e caracterizar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides.
- Produzir e caracterizar hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados.
- Avaliar o efeito terapêutico do hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados frente à hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em camundongos suíços modelo de dor neuropática periférica, comparando com o creme comercial de referência e hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides dissolvidos em solução etanólica.
- Verificar a manutenção do efeito terapêutico após a interrupção do tratamento pelo hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados frente à hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em camundongos suíços modelo de dor neuropática periférica, comparando com o creme comercial de referência.
- Desenvolver metodologia bioanalítica via LC-MS/MS para quantificação simultânea de capsaicinóides livres a partir de amostras de microdializado dérmico de ratos.
- Realizar estudos de microdiálise dérmica, avaliando o perfil dermatofarmacocinético, em ratos *Wistar* machos utilizando o hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados, comparando com o creme comercial de referência e hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides dissolvidos em solução etanólica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiologia da dor

Para compreensão do processo de desenvolvimento da dor neuropática periférica e ação dos capsaicinóides é importante lembrar os principais mecanismos fisiológicos que ocorrem na transmissão do impulso doloroso, designado nocicepção (KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008). O processo nociceptivo, interpretado como experimentação de dor, ocorre a partir de um estímulo de origem mecânica, térmica ou química potencialmente lesiva que provoca injúria tecidual e liberação de substâncias como histaminas, prostaglandinas, interleucinas, bradicinina e substância P, as quais sensibilizam as terminações nervosas livres. Esta sensibilização juntamente com o estímulo nocivo, permite alteração conformacional em receptores com limiar de excitabilidade alto (nociceptores), influxo de íons sódio no meio intracelular e despolarização dos neurônios presentes na periferia, também chamados neurônios de primeira ordem. Estes neurônios de primeira ordem projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, onde se localizam seus corpos celulares, e com a chegada do potencial de ação tornam-se altamente permeáveis ao íon cálcio. A entrada do cálcio no corpo celular induz a liberação de neurotransmissores como glutamato, aspartato e substância P a partir de vesículas pré-sinápticas, provocando a transmissão do impulso nociceptivo aos neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem ascendem até regiões supraespinhais através das vias caudorrostrais nociceptivas, propagando o estímulo às células neuronais localizadas no tronco encefálico, tálamo e hipotálamo. Estas regiões comunicam-se com o córtex somatossensorial e sistema límbico onde a informação é interpretada gerando a experiência de dor (WOOLF e MA, 2007; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; PERGOLIZZI *et al.*, 2013).

Os neurônios de primeira ordem, portanto, possuem função de percepção do estímulo nocivo, atuando na preservação da homeostasia tissular, e agrupam-se em fibras designadas como Fibras A β (beta), Fibras A δ (delta) e Fibras C, as quais diferem de acordo com seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução do impulso nervoso (MILLAN, 1999):

- As fibras A β (beta) são fibras consideradas grandes, mielinizadas, possuem diâmetro maior que 10 μm , são responsáveis pela transmissão rápida de estímulos nervosos (velocidade de 30-100 m/s) e, em circunstâncias normais, transmitem apenas sensações inócuas ao organismo como tato, vibração e pressão (MILLAN, 1999; LEWIS e RICE, 2014).
- As fibras A δ (delta) são fibras mielinizadas de diâmetro médio (2 a 6 μm), responsáveis pela transmissão de estímulos em velocidade intermediária (12-30 m/s), sendo capazes de modular a primeira fase da dor, e conduzem as sensações mais agudas, como dor semelhante à pontada, característico do processo de alodínia mecânica (MILLAN, 1999; LEWIS e RICE, 2014).
- As fibras C, por sua vez, são fibras não mielinizadas de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), responsáveis pela transmissão de estímulos nervosos em velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s) e modulam, principalmente, a dor difusa e dor por queimação (MILLAN, 1999; LEWIS e RICE, 2014).

Assim entende-se o mecanismo fisiológico de transmissão da dor, que está vinculado às áreas periféricas e áreas sensitivas e emocionais cerebrais como córtex somatossensorial e sistema límbico, justificando, portanto, o caráter subjetivo da experiência de dor, bem como a necessidade de uma avaliação terapêutica e multidisciplinar para diagnosticá-la (HOFBAUER *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que este processo exerce função protetora ao organismo e visa evitar danos recorrentes ao local inicialmente lesado, ao mesmo tempo em que permite a cicatrização tecidual adequada. No entanto, nos casos de DNP, ocorre uma disfunção neste mecanismo, que leva a sensibilização central e periférica, permitindo a deflagração de impulsos nociceptivos de forma espontânea e/ou ectópica, gerando a sensação de dor recorrente.

3.2 Dor Neuropática periférica (DNP)

A dor neuropática periférica (DNP) pode ser definida como dor crônica que ocorre como consequência de uma disfunção ou lesão no sistema nervoso central ou periférico e advém mesmo na ausência de estímulos físicos, térmicos, elétricos, químicos e/ou a partir de estímulos anteriormente inócuos ao organismo (ONOFRE, 2009). Os primeiros casos descritos de dor com origem neuropática datam de estudos realizados por Déjerine e Roussy em 1906, os quais descreveram os primeiros episódios de síndrome talâmica em pacientes que apresentavam dores intensas, persistentes e geralmente intoleráveis. Desde então, os casos de DNP foram melhor avaliados e relatados, havendo mais atenção às suas possíveis causas e tratamentos (BOIVIE, LEIJON e JOHANSSON, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1999; SANTOS e GOZZANI, 2011; BRIGO *et al.*, 2013).

Etiologicamente, sabe-se que após a lesão nos neurônios aferentes primários, ocorre o desenvolvimento de resposta inflamatória com liberação de mediadores químicos como prostaglandina, substância P, histamina e bradicinina. Estas substâncias agem provocando dilatação arteriolar, aumento da permeabilidade capilar e recrutamento de células imunes como macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos, cuja ativação induz a liberação de citocinas, como interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), processo que leva a sensibilização periférica e influxo de sódio e cálcio no terminal nociceptivo. O conjunto destes fatores (lesão/inflamação/sensibilização) induz a redução do limiar excitatório nos neurônios de primeira ordem, hipersensibilidade local e atividade ectópica espontânea nas fibras C e A δ , deflagrando potenciais de ação a partir de estímulos anteriormente inócuos ao organismo ou mesmo na ausência de estímulo, culminando com a sensação de dor (PERGOLIZZI *et al.*, 2013).

O acúmulo de mediadores inflamatórios também induz o aumento da expressão de receptores de canais iônicos que controlam a excitabilidade neuronal, tanto nos neurônios periféricos como no corno dorsal da medula espinhal (OKURA *et al.*, 2014). Destaca-se o aumento na expressão de receptor vanilóide potencial transiente subtipo 1 (TRPV1), que é ativado principalmente, a partir de estímulos químicos e térmicos, nas fibras A e C não danificadas, fato

que contribui significativamente com a hipersensibilidade térmica (BARON, 2006), que pode ser tão pronunciada, a ponto do limiar de ativação destes neurônios se aproximar da temperatura corporal. Este fato pode levar espontaneamente à despolarização neuronal e geração espontânea de dor em queimação (VON, BARON e WOOLF, 2012).

A sensibilização central é outro fenômeno importante no desenvolvimento da DNP; este acontecimento inclui aumento na excitabilidade na membrana pós-sináptica alterando a intensidade e duração do estímulo doloroso, ao mesmo tempo em que amplia os campos receptivos de neurônios do corno dorsal da medula espinhal, facilitando a transmissão dos impulsos periféricos (ROCHA *et al.*, 2007). Esta sensibilização ocorre a partir da liberação de glutamato, substância P, aspartato e peptídeo geneticamente relacionado à calcitonina dos neurônios periféricos no corno dorsal da medula espinhal. Estas substâncias ativam receptores do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropilônico), cainato e N-Metil-D-Aspartato (NMDA) na membrana pós-sináptica, deflagrando potencial de ação, indução da produção prostaglandinas E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO) e aumento na liberação de cálcio nos neurônios de segunda ordem. Estes, por sua vez, também induzem a maior liberação de neurotransmissores excitatórios (como glutamato e substância P) na fenda sináptica, gerando uma transmissão sináptica cumulativa, prolongada e assíncrona principalmente em fibras C, fato que amplifica e prolonga a resposta ao estímulo doloroso, fenômeno conhecido como sensibilização central (VON, BARON e WOOLF, 2012; ROCHA *et al.*, 2007).

Todas essas mudanças, portanto, induzem respostas exacerbadas das fibras A δ a partir de estímulos anteriormente táteis ou inócuos ao organismo, processo que origina a dor em pontada - condição conhecida como alodínia mecânica (VON, BARON e WOOLF, 2012; ROCHA *et al.*, 2007); enquanto que, o estímulo inócuo sobre as fibras C também deflagra potenciais de ação a partir da periferia, gerando a sensação de dor em queimação - condição conhecida como hiperalgesia térmica. Desta forma, explicam-se as queixas características dos pacientes com DNP, os quais relatam parestesia (sensação anormal como formigamentos), disestesias (sensação desagradável, normalmente de queima provocando dor por descargas ectópicas em qualquer tipo de fibra nervosa), alodínia, e hiperalgesia térmica.

É importante mencionar também, que o organismo possui vias inibitórias da dor, as quais são ativadas assim que a informação nociceptiva chega ao tronco cerebral, tálamo, hipotálamo e córtex cerebral. Estes sistemas são regulados principalmente pela substância cinzenta periaquedutal e pelo núcleo mágnio da rafe, os quais estimulam vias descendentes através da liberação de monoaminas (serotonina e noradrenalina). Estas monoaminas agem inibindo interneurônios excitatórios ou estimulando interneurônios inibitórios - células que se localizam na região das sinapses entre os neurônios de primeira e segunda ordem - através de ação sobre receptores serotoninérgicos (5-HT_{1B/D}, 5-HT_{1A}) e α -adrenérgicos (α 1 e α 2), reduzindo significativamente o controle do impulso nociceptivo e a sensação de dor (KWON *et al.*, 2014; STEEDS, 2013).

Além disto, também há um aumento na secreção de peptídeos opióides como encefalinas e endorfinas, os quais agem através de receptores μ (μ), κ (kappa) e δ (delta), reduzindo o influxo de íons cálcio e a secreção de neurotransmissores excitatórios (como glutamato e substância P) a partir dos aferentes primários, permitindo a hiperpolarização dos neurônios de segunda ordem e a redução do estímulo nociceptivo (KWON, 2014; ONOFRE *et al.*, 2009). Somando-se a este conjunto de fatores, o organismo também passa a sintetizar e liberar endocanabinóides, como anandamida e 2-araquidonoil glicerol, nos neurônios de segunda ordem. Estas substâncias agem inibindo o processo nociceptivo de múltiplas maneiras. Entre elas, cita-se a atuação sobre os receptores canabinóides subtipo 1 (CB1) nos neurônios pré-sinápticos alterando a permeabilidade aos íons cálcio com a consequente inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios e indução de dor (STEEDS, 2013; FINE e ROSENFELD, 2013; RICE, FARQUHAR e NAGY, 2002).

No entanto, no desenvolvimento da dor neuropática periférica, este conjunto complexo de atividades antinociceptivas também está defeituoso. Este fato ocorre, provavelmente, como consequência do processo de sensibilização central, o que também contribui com a alteração do limiar excitatório nociceptivo e ampliação da sensação dolorosa, inclusive para locais não lesionados no organismo (KWON *et al.*, 2014).

Assim, fica evidente que a DNP está associada à lesão tecidual inicial, sensibilização periférica, sensibilização central e alteração nas vias descendentes inibitórias da dor. Desta forma, o quadro que se manifesta

cl clinicamente é de dor constante, com o desenvolvimento de anormalidades sensoriais como disestesia, hiperalgesia e alodínia, acarretando considerável impacto na qualidade de vida do indivíduo. Desta forma, faz-se necessário a utilização de tratamentos medicamentosos eficazes para alívio sintomatológico dos pacientes que possuem DNP.

3.3 Tratamentos para a DNP

As formas de tratamento da DNP em geral, visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes aliviando a dor. Entre os tratamentos descritos, tem-se o uso de anticonvulsivantes como: 1) gabapentina, pregabalina e ácido valpróico, que agem bloqueando canais de cálcio, ao mesmo tempo em que estimulam a secreção de ácido gama aminobutírico (GABA – principal neurotransmissor inibitório) (EISENBERG *et al.*, 2007; WIFFEN *et al.*, 2013); 2) carbamazepina e lamotrigina, que se ligam especificamente aos canais de sódio, impedindo seu influxo e transmissão sináptica (EISENBERG *et al.*, 2007; WIFFEN *et al.*, 2013); 3) topiramato, que reduz a liberação de glutamato a partir dos neurônios de primeira ordem, além de bloquear canais de sódio, cálcio e promover a inibição de receptores AMPA e cainato (EISENBERG *et al.*, 2007; WIFFEN *et al.*, 2013).

O uso de antidepressivos também se mostra bastante importante no tratamento da DNP. Nesta classe de medicamentos destacam-se os antidepressivos tricíclicos, como amitriptilina, imipramina e nortriptilina, que além de inibirem a recaptção de serotonina e noradrenalina, também bloqueam os canais de sódio e os receptores NMDA, reduzindo a transmissão nociceptiva. Têm-se também os antidepressivos inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRSN), como a venlafaxina e a duloxetina que ao inibirem a recaptção de ambos neurotransmissores, permitem maior estímulo das vias inibitórias da dor. Por ultimo, têm-se os inibidores seletivos da recaptção de serotonina como fluoxetina, paroxetina, citalopram e sertralina, porém estes são menos eficazes, pois mantém apenas a ação da via serotoninérgica, o que os difere dos antidepressivos tricíclicos e dos ISRSN e destaca a importância da via noradrenérgica como via inibitória da dor (KERR *et al.*, 2015; SINDRUP *et al.*, 2005; MENDLIK e URITSKY, 2015).

Desta maneira, fica claro que os antidepressivos e anticonvulsivantes agem reduzindo a transmissão do impulso nociceptivo e/ou estimulando as vias inibitórias nociceptivas, reduzindo a sensação de dor pelos pacientes (SINDRUP *et al.*, 2005). Outro aspecto relevante é que os antidepressivos e os anticonvulsivantes também agem reduzindo a ansiedade, melhorando a qualidade do sono e o comprometimento psicológico do indivíduo, que geralmente possui outra doença de base, o que também auxilia no combate subjetivo da dor e melhora significativamente a qualidade de vida dos pacientes (MAIZELS e MCCARBERG, 2005).

Outro grupo de fármacos utilizados para o tratamento da DNP são os opióides como codeína, metadona e tramadol, os quais também desempenham papel importante frente a DNP. A eficácia destes fármacos é comparada a dos antidepressivos tricíclicos e agem, de maneira geral, como agonistas dos receptores opióides tipo μ , kappa e delta, reforçando a ação fisiológica das endorfinas e das vias inibitórias da dor. Eles também inibem a liberação de substância P, hiperpolarizando os neurônios aferentes do corno dorsal da medula espinhal, reduzindo a experimentação de dor (MENDLIK e URITSKY, 2015).

Como viés à terapêutica com todas estas classes de fármacos, está a ausência do alívio completo da dor e a indução de efeitos adversos expressivos - fatores que diminuem a adesão ao tratamento e reduzem ainda mais seus benefícios. Entre os efeitos adversos dos anticonvulsivantes, pode-se citar sonolência, tontura, fadiga, náusea, sedação, ganho de peso, diplopia (para carbamazepina) e discrasia sanguínea (MAIZELS e MCCARBERG, 2005); para os antidepressivos, observa-se sudorese, tonturas, hipotensão ortostática, constipação, dispepsias, aumento no risco de suicídio para jovens e crianças, além da impossibilidade de uso dos antidepressivos tricíclicos em pacientes cardiopatas (MAIZELS e MCCARBERG, 2005); Por último, os fármacos opióides, caracterizam-se por provocar hipotensão, bradicardia, constipação, náusea, vômito, retenção urinária, sedação e sonolência (CARTER, 2014).

Neste sentido, faz-se necessário a utilização de abordagens alternativas mais eficientes e com menor número de efeitos adversos para o tratamento da DNP. Atualmente, há uma série de pesquisas utilizando novos compostos em estudos clínicos e pré-clínicos. Como exemplo, cita-se Rice e colaboradores

(2014) que realizaram estudo clínico de fase 2, administrando EMA401 100mg duas vezes por dia, substância antagonista seletiva de receptor de angiotensina II, que também é expresso em neurônios nociceptivos. Os autores verificaram capacidade indutora de analgesia comparada com os melhores tratamentos já utilizados para dor neuropática pós-herpética. No entanto, ressaltam que a ausência de efeitos adversos do composto, sugere que a dose terapêutica pode ser melhor estudada, obtendo resultados ainda mais promissores no alívio da dor.

Outra terapia experimental que mostra-se com alto potencial entre as relatadas na revisão de Papanas e Ziegler, (2016), é o uso da microgabalina (DS-5565), que também em estudo de fase 2 demonstrou ser eficaz na redução da dor, sendo segura e bem tolerada nas doses de 15, 20 e 30 mg/dia (administradas através da via oral), que evidencia sua potencialidade para o tratamento de dor neuropática periférica de origem diabética (VINIK *et al.*, 2014).

Cabe mencionar também que Sawynok, (2014) relata que a analgesia induzida por substâncias tópicas, é da mesma ordem de magnitude da analgesia induzida por medicamentos orais. Este fato confere interesse a esse tipo de terapia devido à redução de efeitos adversos sistêmicos, assim como interações medicamentosas. Neste sentido, Bertrand e colaboradores (2015) avaliaram o alívio da dor em estudo duplo cego provocado por creme contendo manitol, reduzindo o nível de dor pelos pacientes, provavelmente frente a efeito sobre receptores TRPV1. Campbell e colaboradores (2012) também realizaram estudo duplo cego controlado por placebo aplicando gel contendo clonidina, um agonista α 2-adrenérgico, através da via tópica verificando alívio da dor nos pés de indivíduos diabéticos.

Seguindo este tipo de tratamento, chama-se atenção às formulações tópicas existentes no mercado farmacêutico. Entre elas, mencionam-se os cremes compostos por anestésicos tópicos, como lidocaína, que inibe a transmissão sináptica provocando alívio da dor através do bloqueio dos canais de sódio de fibras A δ e C. Contudo, este único mecanismo de ação, restringe o uso da lidocaína e sua eficácia, isto porque o impulso nociceptivo, principalmente em pacientes com DNP, é complexo e multifatorial (DYVEKE *et al.*, 2015).

Acompanhando estas estratégias terapêuticas, e conferindo interesse à presente pesquisa, chama-se atenção às terapias tópicas contendo

capsaicinóides, também disponíveis no mercado farmacêutico, como por exemplo, os cremes, loções e adesivos transdérmicos que provocam alívio da dor, mas também induzem efeitos adversos significativos.

3.4 Capsaicinóides

Os capsaicinóides são compostos alcalóides, metabólitos secundários das pimentas do gênero *Capsicum*, caracterizam-se por sua ação pungente e são representados pela capsaicina (CAPS), dihidrocapsaicina (D-CAPS) (Figura 1), nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina e homocapsaicina (WAHYUNI *et al.*, 2013; KOLEVA *et al.*, 2013). A CAPS foi o primeiro capsaicinóide isolado em 1816, sua estrutura química foi elucidada em 1919, e sua síntese ocorreu pela primeira vez em 1930. Seus análogos foram isolados posteriormente em 1961 sendo nomeados como capsaicinóides (CHHABRA *et al.*, 2012; PAPOIU e YOSIPOVITCH, 2010).

A CAPS e a D-CAPS (Figura 1) compõem 90% dos capsaicinóides, agem de forma equivalente sobre os receptores TRPV1 (em níveis de concentração nanomolar), possuindo capacidade indutora de pungência 2 a 3 vezes maior quando comparado às outras moléculas e, serão designados como capsaicinóides nesta tese (WAHYUNI *et al.*, 2013; KOLEVA *et al.*, 2013). Ambas as substâncias são lipofílicas, diferem-se pela presença de uma dupla ligação na cadeia carbônica lateral (Figura 1), possuem coeficiente de partição octanol/água (Log P) de 3,33 para a CAPS e 4,11 para a D-CAPS e peso molecular de 306 e 308, para CAPS e D-CAPS, respectivamente (DÖMÖTÖR *et al.*, 2007; JANCSÓ *et al.*, 2008; CONTRI *et al.*, 2011; ANAND e BLEY, 2011; YOU *et al.*, 2013; JÁNOS, 2014; WANG *et al.*, 2015; POHLMANN, *et al.*, 2016).

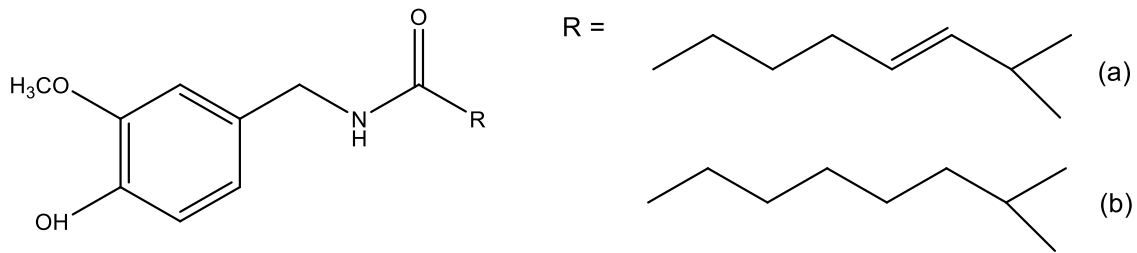


Figura 1. Estrutura química da (a) capsaicina (b) dihidrocapsaicina.

Quanto à farmacocinética, sabe-se que a CAPS e a D-CAPS são rapidamente absorvidas quando administradas via oral, possuem alta taxa de ligação as proteínas plasmáticas (sendo que para a CAPS é maior que 90%) e são rapidamente metabolizadas pelas enzimas microssomais do citocromo P-450 no fígado, antes de atingir a circulação sistêmica. A eliminação dos compostos ocorre majoritariamente através da urina, excretados na forma de seus metabólitos, e possuem um curto tempo de meia vida para ambos os fármacos (sendo de aproximadamente 25 minutos, para a CAPS) (SURESH e SRINIVASAN, 2010; DE LOURDES, GONZALEZ e VAZQUEZ, 2011). Estes dados são corroborados por estudos realizados por Chaiyasit e colaboradores (2009) que avaliaram o perfil farmacocinético da CAPS em 12 voluntários saudáveis que ingeriram 25 mg do fármaco. A CAPS foi detectada em plasma 10 minutos após sua administração, sendo que a concentração máxima (C_{max}) foi de 2,5 ng/mL; o tempo necessário para atingir essa concentração máxima (T_{max}) foi de 45 minutos e a área sob a curva (ASC) do fármaco foi de 104 ng.min/mL - dados que caracterizam seu rápido metabolismo hepático, que aparentemente é similar em microssomos de humanos, ratos e cães (DE LOURDES, GONZALEZ e VAZQUEZ, 2011).

Entretanto, quando os capsaicinóides são administrados através da via tópica muda-se essa perspectiva. O trabalho conduzido por Chanda e colaboradores (2008) no qual capsaicinóides foram administrados na pele após serem dissolvidos em soluções de álcool isopropílico, óleo mineral e propilenoglicol, na dose de 150 μ g em 12 voluntários, determinou que o tempo de meia vida dos capsaicinóides foi de aproximadamente 24h (em todas as formulações), enquanto que os valores de ASC e C_{max} , para a solução de álcool isopropílico, que obteve maior absorção dos fármacos, foi de 25 μ g e 352 μ g/h, respectivamente. Estes estudos levaram a conclusão de que a CAPS e a D-

CAPS possuem partição e eliminação semelhantes no estrato córneo de humanos, mostrando que suas diferenças físico-químicas não foram significativas a ponto de alterar estes parâmetros. Por último, pode-se mencionar que a diferença no $t_{1/2}$ dos fármacos, quando administrados via tópica ou via oral, pode ser justificada pela grande variação de metabolismo via citocromo P450 na pele e nos hepatócitos (CHANDA, *et al.*, 2008; PERSHING *et al.*, 2004). Este alto valor do $t_{1/2}$ na pele, quando comparado ao $t_{1/2}$ sistêmico, também torna a utilização de capsaicinóides através da via tópica, que é o sítio de ação dos capsaicinóides frente à DNP, mais atraente, pois ficaria maior tempo em contato com seu local de ação específico, permitindo assim sua atividade terapêutica adequada (CHANDA *et al.*, 2008).

Em relação à farmacodinâmica, estudos têm mostrado diferentes efeitos dos capsaicinóides. Foram observados desde efeitos protetores gastrointestinais, até efeito contra prurido e dor proveniente de erupções cutâneas, efeitos contra psoríase, supressão de tumores, aumento do metabolismo lipídico e, principalmente, contra DNP (HAYMAN e KAM, 2008; DE LOURDES, GONZALEZ e VAZQUEZ, 2011; AGGARWAL *et al.*, 2008).

A CAPS é um fármaco agonista potente e altamente seletivo dos receptores TRPV1 – canais de cálcio controlados pelo ligante – bastante encontrados na membrana plasmática e retículo endoplasmático de neurônios sensoriais periféricos, principalmente fibras C (onde se encontram em maior concentração) e fibras A δ (em menor quantidade). Estas fibras C e A δ , são amplamente localizadas em derme, epiderme, epitélio respiratório e língua, respondendo principalmente a altas temperaturas (maiores que 43°C) e pH ácido (pH < 6,0) (DE LOURDES, GONZALEZ e VAZQUEZ, 2011; PERSHING *et al.*, 2004; ANAND e BLEY, 2011).

Em relação ao mecanismo de ação da CAPS frente à DNP, sabe-se que a ativação dos receptores TRPV1, induz uma cascata de processos bioquímicos que resultam primeiramente na inativação dos canais de sódio voltagem dependente, o que inibe o influxo deste íon ao interior celular, e dá início a redução da excitabilidade e responsividade neuronal. A ligação aos receptores TRPV1 também leva ao aumento nas concentrações de cálcio intracelulares (tanto pelo aumento da permeabilidade deste íon a membrana plasmática como por estímulo direto sobre o retículo endoplasmático, que passa a liberar cálcio

no meio intracelular), o que provoca a ativação de enzimas cálcio dependente (como proteases celulares), levando a despolimerização dos microtúbulos celulares e, conseqüente, ao rompimento do citoesqueleto neuronal e transporte axonal. Somando-se a isto, o fármaco também age no sítio de ação da ubiquinona das mitocôndrias existentes nos terminais periféricos neuronais, onde se liga de maneira competitiva e, juntamente com as altas concentrações de cálcio intracelular, inibem a cadeia de transporte de elétrons e a respiração celular (ANAND e BLEY, 2011). Esse conjunto de atividades leva a desfuncionalização dos neurônios nociceptivos, perda da integridade da membrana celular, depleção de substância P, glutamato e peptídeo genéticamente relacionado à calcitonina. Desta forma, ocorre um colapso das terminações nervosas e perda da resposta neuronal a estímulos nociceptivos por períodos prolongados, aliviando, portanto a DNP (ANAND e BLEY, 2011).

Destaca-se também, que a CAPS exerce ação nas fibras A δ e C, provocando o alívio da dor relacionada principalmente ao calor, mas não há perda do tato e sensibilidade ao frio, como ocorre com outros analgésicos tópicos, como por exemplo, lidocaína (NOLANO *et al.*, 1999). A inibição do processo nociceptivo realizado pela CAPS, no entanto, só acontece quando há um estímulo persistente sobre os receptores TRPV1, pois em casos de estimulação intermitente, há estímulo neuronal com a conseqüente sensação de dor em queimação, picadas e coceiras; isto porque, o influxo de cálcio provocado pela CAPS, auxiliaria na deflagração do impulso nociceptivo, não em sua inibição (ANAND e BLEY, 2011).

Atualmente, a CAPS é encontrada em diferentes formas farmacêuticas no mercado. Chama-se atenção aos cremes, loções e ao adesivo transdermico contendo capsaicinóides. O adesivo contém altas concentrações de CAPS (8%), enquanto que os cremes e loções apresentam-se com 0,025% ou 0,075% do fármaco.

A alta concentração de CAPS no adesivo exige uma série de cuidados antes, durante e após sua aplicação. Antes da aplicação, é importante a utilização de cremes contendo lidocaína, evitando dor excessiva induzida pela própria CAPS. Quanto à aplicação, esta deve ser de 30 minutos quando colocado nos pés, e de 60 minutos quando administrado em outras partes do corpo. As aplicações devem ser realizadas por médicos ou sob supervisão

médica; para garantir a segurança dos pacientes frente a algum transtorno gerado pela grande exposição aos capsaicinóides. Após esse tempo de aplicação, retira-se o adesivo com cuidado, e a área tratada é limpa com gel fornecido pelo próprio fabricante. Os pacientes posteriormente, também devem ter cuidados nos primeiros dias após a aplicação do adesivo, evitando, por exemplo, o contato da área tratada com roupas contaminadas com os fármacos ou com outros materiais que possam provocar dor. Não obstante, os pacientes são acompanhados via telefone nos períodos de 24h, 72h e 96h após a aplicação do adesivo. Neste momento, os pacientes devem relatar dores e sanar dúvidas com os profissionais. O intervalo para repetir o tratamento é de 3 meses ou mais (BARANIDHARAN, DAS e BHASKAR, 2013).

Por outro lado, os cremes contendo capsaicinóides, são pouco efetivos, devem ser aplicados 3-4 vezes ao dia e fornecem apenas alívio parcial da dor. Isto dificulta a adesão ao tratamento e a eficácia frente aos processos de DNP. Somando-se a isto, os cremes e adesivos apresentam uma série de efeitos adversos que dificultam sua utilização pelos pacientes. Entre estes efeitos, pode-se citar sensação de queimação local, eritema, prurido, pápulas, vesículas, edema, inchaço e secura na pele, assim como outros efeitos adversos considerados pouco comuns, como hipertensão, disgeusia e irritação nos olhos (ASTELLAS, 2013; KERN *et al.*, 2013; DERRY *et al.*, 2013).

Frente a estes inconvenientes, o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada, como nanocápsulas poliméricas, contendo capsaicinóides torna-se uma alternativa atraente para melhorar a eficácia, aumentar a adesão ao tratamento, reduzir os seus efeitos adversos e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

3.5 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos, estáveis e eficientes, e englobam as nanocápsulas e nanoesferas, as quais se diferem de acordo com sua estrutura e composição. As nanocápsulas são sistemas poliméricos, que geralmente possuem diâmetro de 100 a 500 nm, e apresentam-se como um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, sendo que o fármaco encapsulado pode ficar no compartimento oleoso e/ou no

sistema polimérico, assim como adsorvido na interface partícula/água. Por sua vez as nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos e o fármaco fica dentro o sistema polimérico ou adsorvido à sua superfície (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010; HOFFMEISTER *et al.*, 2012).

As vantagens na utilização das nanocápsulas, em relação às nanoesferas, são a alta eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos e o baixo conteúdo de polímero, o que facilita sua degradação, quando comparado às nanoesferas. As nanocápsulas também promovem a proteção dos ativos frente a condições adversas como temperatura, oxigênio, luz e pH, sendo bastante pesquisadas para a entrega seletiva e prolongada de fármacos no sítio de ação do medicamento; fato que pode aumentar a adesão e eficácia do tratamento (mesmo com redução de dose) e diminuição dos efeitos adversos provocados pelos fármacos (BERNARDI *et al.*, 2008; GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007; LENZ *et al.*, 2012; ALAM *et al.*, 2010).

As nanocápsulas poliméricas são passíveis de serem administradas por diferentes vias, tais como oral, intravenosa, pulmonar e tópica (DOMB *et al.*, 2007). Isto faz destes sistemas excelentes alternativas para distintas aplicações diante de diversas patologias, como as doenças que acometem o sistema nervoso central, cânceres, pulmão, coração e dor com origem neuropática (DOMB *et al.*, 2007).

Quanto ao tratamento frente à DNP através da via tópica, estas partículas promovem um contato íntimo com a pele de maneira duradoura, podendo promover a entrega gradual e seletiva de fármacos em derme e epiderme viável (ALVES, 2006; CONTRI 2013a), que são locais de alta concentração dos receptores para dor (como receptores TRPV1), tornando assim, estes sistemas com potencial para o tratamento da DNP. Esta afirmativa é corroborada por pesquisas, como por exemplo, a realizada por Raza e colaboradores (2014), que encapsularam CAPS em suspensão de carreadores lipídicos nanoestruturados e obtiveram sistemas nanométricos com baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo e melhor efeito terapêutico frente à hiperalgesia térmica. Estes resultados foram observados quando estes carreadores lipídicos nanoestruturados foram incorporados em géis de carbopol, comparados a um creme convencional e gel com dispersão dos fármacos. Neste mesmo sentido, Garcia e colaboradores (2011) associaram amitriptilina, imipramina e doxepina

às nanocápsulas poliméricas de poli(lactideo-co-glicolídeo), as caracterizaram e aplicaram através de injeção intraplantar em modelo de DNP. Os autores verificaram que as partículas eram nanométricas, com baixo índice de polidispersão, e proporcionaram um perfil de liberação controlada dos fármacos. Na avaliação frente à alodínia e hiperalgesia térmica foi verificado que as nanocápsulas contendo os fármacos mostraram efeito terapêutico superior quando comparadas com as soluções contendo fármaco livre, com destaque para as nanocápsulas contendo doxepina que apresentaram melhor efeito frente à alodínia e hiperalgesia térmica, tornando este sistema uma alternativa potencial para tratamentos que visam o alívio da dor.

Por último, destacamos os trabalhos de Contri e colaboradores (2010; 2011; 2013a; 2014) pertencentes ao nosso grupo de pesquisa de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, que desenvolveram e caracterizaram suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides como alternativa para o tratamento da DNP. Ao desenvolver as suspensões de nanocápsulas, utilizando como polímero o Eudragit RS100®, os autores obtiveram suspensões com partículas nanométricas (com aproximadamente 140 nm de diâmetro), de caráter monomodal, potencial zeta positivo (próximo de 10 mV) e alta eficiência de encapsulação dos fármacos (aproximadamente 100%). Também verificaram que as suspensões mostraram-se estáveis durante 90 dias, promovendo liberação prolongada dos capsaicinóides (liberação de aproximadamente 40% dos fármacos em 96h) seguindo uma cinética monoexponencial, caracterizando liberação dos fármacos através de difusão e relaxação da cadeia polimérica da partícula. As características físico-químicas foram consideradas adequadas pelos autores e estimularam mais estudos para avaliar o potencial destas suspensões na melhoria da atividade farmacológica e redução dos efeitos adversos dos capsaicinóides. Sendo assim, foi proposta a utilização destas suspensões para compor a estrutura de hidrogéis de quitosana para aplicação via tópica.

3.6 Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados (HQNC_{Caps})

Com o propósito de viabilizar a administração tópica das suspensões de nanocapsulas poliméricas contendo capsaicinóides, de melhorar o efeito terapêutico, e de reduzir os efeitos adversos do tratamento da DNP utilizando estes fármacos, Contri e colaboradores (2010) propuseram e desenvolveram HQNC_{Caps}. Os autores iniciaram o trabalho realizando estudo de otimização da formulação do hidrogel utilizando água em sua composição, que posteriormente foi substituída pelas suspensões de nanocápsulas poliméricas. Neste estudo, variou-se a concentração de quitosana (médio peso molecular) em 2,0; 3,5 e 5,0%; e ácido láctico em 1,5; 2,0 e 3,5% na formulação, mantendo constante a concentração de água e diazolinidilureia (0,5%). Os géis foram caracterizados de acordo com o perfil reológico e pH. Após a caracterização, foi definido que o hidrogel com 2,5% de quitosana e 1,5% de ácido láctico mostrou-se mais adequado para aplicação tópica. Isto porque, os valores de pH, consistência e índice de fluxo, foram considerados mais apropriados para aplicação tópica destes sistemas. Estes hidrogéis ainda apresentaram um comportamento reológico do tipo pseudoplástico, considerado adequado para aplicação cutânea e modelado matematicamente de acordo com equação proposta pelo modelo de Ostwald (Contri *et al.*, 2010).

A partir destes resultados, e de conhecimento que o hidrogel mantém as estruturas nanométricas em sua composição, os autores substituíram 50% da água que compunha a formulação inicial do hidrogel, por suspensão de nanocápsulas poliméricas e, em seguida, caracterizaram os hidrogéis obtidos. Foi observado que a adição das suspensões de nanocápsulas não alterou o pH dos hidrogéis, porém provocou aumento da viscosidade do sistema, indicando alteração da reticulação das cadeias de quitosana pelas nanopartículas. Além disto, o hidrogel composto com as suspensões de nanocápsulas poliméricas também manteve o comportamento reológico pseudoplástico seguindo o modelo matemático de Ostwald. Em seguida, os teores de capsaicinóides no hidrogel foram avaliados, situando-se em valores próximos a 100% das concentrações teóricas (Contri *et al.*, 2010).

Na sequência, foi realizado estudo de liberação dos capsaisinóides comparando o HQNC_{Caps} com outros dois tipos de hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides: um dissolvido em solução etanólica (Hidrogel-ET), e outro composto por solução micelar (Hidrogel-MS). Foi observado que o

HQNC_{Caps} promoveu uma liberação prolongada e sustentada dos capsaicinóides, liberando aproximadamente 42% de CAPS e 31% de D-CAPS em 96h; enquanto que o Hidrogel-ET liberou 81% de CAPS e 74% de D-CAPS; e o Hidrogel-MS liberou 72% de CAPS e 59% de D-CAPS, neste mesmo período - 96h (Contri *et al.*, 2010).

Em trabalho subsequente, foram avaliadas a adesão e a permeação dos capsaicinóides em pele de porco através do método de célula de Franz e célula de Franz modificado. Neste estudo, comparou-se o HQNC_{Caps}, com um hidrogel de quitosana (HQ) composto por solução micelar de capsaicinóides e um hidrogel de hidroxietilcelulose, também composto com suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides. No estudo de *washability*, foi observado que ocorre maior retenção dos fármacos na pele quando administrados na formulação do HQNC_{Caps}, pois a perda dos fármacos a partir da pele ao ser administrado nesta formulação foi 2 vezes menor para a CAPS e 2,5 vezes menor para a D-CAPS quando comparado ao HQ composto com solução micelar e; 1,3 e 1,4 vezes menor, para CAPS e D-CAPS, respectivamente, quando comparado ao hidrogel de hidroxietilcelulose. Isto ocorre, provavelmente, devido ao aumento da área superficial de contato das nanocápsulas com a pele e também pelo efeito bioadesivo provocado pelo polímero que compõe a parede polimérica das nanopartículas, assim como pelo polímero catiônico formador do hidrogel, a quitosana (Contri *et al.*, 2013a).

No estudo de penetração e permeação cutânea, quando foi avaliada a concentração dos capsaicinóides nas camadas da pele que foram utilizadas previamente no teste de *washability*, houve maior concentração dos fármacos na derme e epiderme, quando os capsaicinóides foram administrados na formulação HQNC_{Caps}. Já no meio receptor houve maior concentração de capsaicinóides, quando os fármacos foram administrados na formulação hidrogel de hidroxietilcelulose formulado com as nanocápsulas poliméricas contendo os capsaicinóides, indicando maior permeação dos fármacos quando administrados através deste hidrogel de hidroxietilcelulose (Contri *et al.*, 2013a).

Quanto ao estudo de penetração cutânea, realizado durante 5h sem execução prévia do ensaio de *washability*, os resultados mostraram que o HQNC_{Caps} e o hidrogel de hidroxietilcelulose contendo capsaicinóides promoveram maior retenção dos fármacos na epiderme, enquanto que na derme

há maior concentração de capsaicinóides quando administrados na forma de HQ composto por solução micelar. No meio receptor não houve diferença significativa na concentração dos fármacos. Os autores sugerem que esta diferença ocorre, provavelmente, pelo aumento da permeabilidade dos fármacos quando em solução micelar, associado à permeação mais lenta das nanocápsulas nas camadas da pele e liberação gradual dos capsaicinóides a partir das nanocápsulas (Contri *et al.*, 2013a).

Por último, também foi realizado um estudo para avaliar em humanos o efeito irritante local, principal efeito adverso dos capsaicinóides. Foram avaliados os seguintes grupos: HQNC_{Caps}, o creme comercial de referência no mercado farmacêutico e o hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides solubilizados em solução etanólica (HQET_{Caps}). Observou-se que o HQNC_{Caps} não causou eritema na pele dos voluntários humanos, enquanto que houve o desenvolvimento de eritema quando os fármacos foram administrados na formulação comercial e na formulação HQET_{Caps}. Ainda neste estudo, em relação à perda transepitelial de água e alteração de pH, não houve diferenças entre as formulações. Quanto a análise sensorial, o creme comercial e o HQET_{Caps} apresentaram maior sensação de irritação cutânea quando comparado ao HQNC_{Caps}. Finalmente, no estudo de permeação cutânea, verificou-se que após 30 horas de experimento, a formulação HQET_{Caps}, promoveu maior transposição dos capsaicinóides através da pele, seguida do creme comercial e, posteriormente, do HQNC_{Caps}. Este conjunto de resultados sugere, portanto, que a irritação pode estar associada com a rápida liberação e absorção dos capsaicinóides na pele, fenômenos contornados pela nanoencapsulação (CONTRI *et al.*, 2014).

Diante do exposto, fica evidente que o HQNC_{Caps} provoca menos efeitos adversos na pele de voluntários humanos e também se mostra como uma possível forma farmacêutica que permite aprimorar o tratamento da DNP com capsaicinóides. A formulação desenvolvida pode, em hipótese, promover maior liberação dos capsaicinóides no local de maior prevalência dos receptores TRPV1 (derme e epiderme) durante maior tempo. Estes resultados estimulam a realização de pesquisas complementares utilizando os HQNC_{Caps}, especificamente, a realização de estudos pré-clínicos que mostrem a eficácia farmacológica da formulação desenvolvida em modelo animal de DNP, e a

análise dermatofarmacocinética, utilizando a técnica de microdiálise, dos capsaicinóides a partir da estrutura destes hidrogéis (CONTRI *et al.*, 2014).

3.7 Modelo Animal de DNP

Os modelos animais de DNP são sistemas experimentais que simulam as neuropatias observadas em humanos e são essenciais para identificar e compreender os mecanismos pelo quais ocorre o processo neuropático, bem como para avaliar novas terapias que possam provocar o alívio e o manejo adequado da dor (RALSTON, 1998). Existem vários modelos animais de DNP e são desenvolvidos por lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas, como bem relatam as revisões de Challa (2015), Jaggi, Jain e Singh (2011) e Thakur e Srivastava (2016). Nesta subseção descreve-se os modelos por lesão traumática que envolvem a transecção, constrição ou ligação parcial do nervo ciático em ratos ou camundongos que, após lesados, desenvolvem comportamentos de autoproteção e apresentam reações exacerbadas frente à estímulos mecânicos (alodínia) e térmicos.

O modelo de transecção completa do nervo ciático é o modelo mais antigo de dor neuropática em animais e envolve a secção completa do nervo ciático ao nível da coxa juntamente com secção do nervo safeno adjacente, induzindo desnervação completa do membro. Este modelo produz dor característica de sintomas clínicos de "membro fantasma", condição conhecida como anestesia dolorosa, que se caracteriza por sensação de dor onde não há qualquer entrada sensorial, circunstância que surge em humanos após amputação de membro ou lesões espinhais transversais (CHALLA, 2015). Neste modelo no entanto, os animais demonstram autotomia (automutilação) excessiva, e por isso tem sido substituído por modelos animais de lesões mais discretas nos nervos, que são igualmente eficazes em produzir comportamento de dor neuropática (JAGGI, JAIN E SINGH, 2011).

O modelo de constrição do nervo ciático, por outro lado, leva a condições patológicas semelhantes às observadas em neuropatias procedentes de trauma ou tumor. Este modelo simula a lesão de fibras nervosas localizadas principalmente na superfície de nervos periféricos, característica de doenças como síndrome do túnel do carpo (CHALLA, 2015). A constrição do nervo ciático,

geralmente leva a autotomia moderada e à reflexos comportamentais característicos de alodínia, hiperalgesia e dor espontânea, sintomas que normalmente atingem seu máximo em 10-14 dias após a cirurgia. A constrição do nervo ciático também gera componente inflamatório além do neuropático, mostrando grande redução de fibras A β e rompimento dos axônios que compõe as fibras A δ , enquanto que as fibras C tendem a permanecerem intactas (CHALLA, 2015). Este modelo é considerado mais adequado para avaliar a alodinia ao frio quando comparado com o modelo de ligação parcial do nervo ciático, descrito a seguir. Como desvantagem no entanto, a autotomia apresentada pelos animais também leva a danos nos dedos das patas traseiras, tornando este modelo inadequado para realizar estudos onde se avalia o reflexo comportamental de retirada de pata (CHALLA, 2015).

Por último relata-se o modelo de ligação parcial do nervo ciático desenvolvido por Seltzer e colaboradores (1990), cuja metodologia foi utilizada neste trabalho. Este modelo simula uma contusão nervosa ao invés de compressão nervosa, fazendo com que os animais, exibam sinais de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica (JAGGI, JAIN E SINGH, 2011; CHALLA, 2015; HUDSON *et al.*, 2001). A ligação parcial do nervo ciático leva a um processo inflamatório e liberação de substâncias neuroativas que induzem a sensibilização periférica e central. Este processo gera a superexpressão de receptores TRPV1 – responsáveis aos capsaicinóides – em fibras A e C não danificadas e um aumento na excitabilidade neuronal (HUDSON *et al.*, 2001), o que faz deste modelo uma ótima alternativa para avaliação do efeito terapêutico de formulações contendo capsaicinóides. Além disto, o modelo de ligação parcial do nervo ciático é altamente reprodutível e o procedimento cirúrgico que induz o desenvolvimento da neuropatia é de fácil execução, vantagens importantes para sua utilização. Como desvantagem, no entanto, cita-se que algumas vezes os animais mostram uma autotomia que leva ao dano nos dedos das patas traseiras gerando a exclusão do animal do experimento.

Como exemplo de trabalho que avaliou sistemas nanotecnológicos contendo fármacos em modelo de ligação parcial do nervo ciático como proposta para tratamento da DNP, cita-se o trabalho de Lalani e colaboradores (2015), que associou lamotrigina a nanopartículas de PLGA funcionalizadas ou não, com lactoferrina e transferrina. Os autores verificaram efeito farmacológico superior

frente à hiperalgesia térmica quando a lamotrigina estava nanoencapsulada, com destaque às funcionalizadas, quando comparadas com a solução do fármaco, evidenciando que os sistemas nanotecnológicos desenvolvidos podem melhorar a atividade farmacológica frente a dor neuropática. Na mesma vertente de ideias, menciona-se o trabalho de Garcia e colaboradores (2011) citado anteriormente, e que também verificou efeitos promissores de antidepressivos tricíclicos quando associados às nanocápsulas poliméricas e avaliados frente a alodínia mecânica no tratamento de modelo animal de DNP.

Diante do exposto, consideramos importante e adequado avaliar o efeito terapêutico das formulações contendo capsaicinóides, frente a alodínia mecânica e hiperalgesia térmica em modelo de animal de ligação parcial do nervo ciático, uma vez que simula de maneira adequada a condição neuropática em humanos, bem como mostra-se uma ótima alternativa para avaliação de formulações contendo capsaicinóides.

3.8 Microdiálise

A microdiálise é uma técnica de amostragem *in vivo* que utiliza sondas específicas as quais permitem mensurar concentrações livres de fármaco (não ligadas às proteínas), ou de outras substâncias, em tecidos ou plasma (CHAURASIA *et al.*, 2007). Esta técnica é particularmente importante em pesquisa farmacocinética e farmacodinâmica, pois são as concentrações livres de fármaco as disponíveis para realizar o efeito farmacológico (CHAURASIA *et al.*, 2007).

Para a realização dessa técnica, diferentes tipos de sondas de microdiálise podem ser utilizadas. Cita-se, por exemplo, as sondas lineares e concêntricas, que são selecionadas de acordo com a pesquisa a ser realizada. Em relação a estudos que envolvem derme e região subcutânea em animais, as sondas utilizadas são as lineares (FIGURA 2), como por exemplo, a sonda CMA 30 (utilizada neste trabalho), cuja porção inicial é uma tubulação de poliimida de 245 mm, que se liga a uma membrana semipermeável composta de cuprofano. Esta membrana possui 10 mm de extensão e um *cut-off* de 6000 Da, que determina a seletividade das substâncias que podem difundir através da mesma. Na outra extremidade da membrana há uma tubulação de saída de mesmo

tamanho e composição da tubulação de entrada e, assim como a tubulação inicial, tem como função manter o fluxo do líquido que é perfundido pela sonda e auxilia a inserção da membrana na região desejada (LANGE; DE BOER e BREIMER, 2000; ZHUANG *et al.*, 2015).

A estrutura da membrana destas sondas e seu respectivo *cut-off* visa mimetizar a parede de capilares teciduais. Assim, ao infundir um fluido que simula o líquido intersticial, denominado perfundido, através do lúmen da sonda (geralmente 0,5 – 5 $\mu\text{L}/\text{min}$), cria-se na região da membrana uma diferença no gradiente de concentração da substância de interesse entre o meio externo (tecido) e o meio interno da membrana (perfundido). Esse gradiente permite a difusão passiva de substâncias através da membrana (Figura 2). Desta maneira, solutos de baixo peso molecular - como moléculas de fármaco - difundem-se para o líquido perfundido compondo então o microdialisado. O microdialisado, após coletado, é analisado por métodos sensíveis e específicos, quantificando a substância de interesse – que representa uma fração da concentração total de fármaco livre no meio, isto porque a diferença de concentração criada na região da membrana ao infundir o perfundido sob fluxo constante, impede seu equilíbrio entre o meio interno e externo obrigando a determinação da recuperação relativa para possibilitar a determinação das concentrações livres teciduais do fármaco de interesse (UNGERSTEDT, 1991; AZEREDO, DALLA COSTA e DERENDORF, 2014; ZHUANG *et al.*, 2015; ZIMMERMANN, TORRES, e DALLA COSTA, 2016).

Para conhecer a recuperação relativa do fármaco, é necessário realizar a calibração das sondas de microdiálise *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* calibram-se as sondas pelos métodos de diálise e retrodiálise. Na diálise *in vitro* determina-se quanto de fármaco é recuperado no microdialisado a partir do meio externo que tem concentração conhecida; já na retrodiálise *in vitro* verifica-se quanto de fármaco é perdido do líquido perfundido, que tem concentração conhecida, para o meio externo. *In vivo* faz-se somente a calibração por retrodiálise, onde se verifica quanto de fármaco é perdido do perfundido para o tecido onde a sonda está inserida (GONZALEZ; SCHMIDT e DERENDORF, 2013).

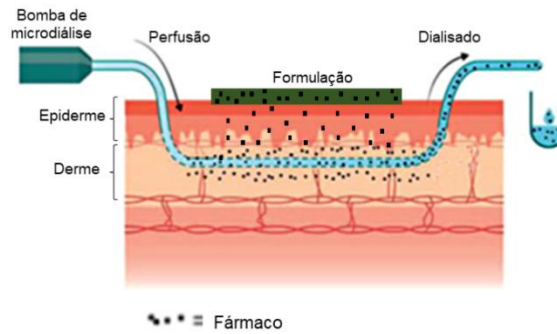


Figura 2. Princípio da microdiálise. Uma solução geralmente fisiológica (o perfundido) é infundido através da sonda de microdiálise. Os compostos difusíveis dentro do tecido dérmico difundem-se pelo gradiente de concentração através da membrana de diálise para o lúmen da sonda, compondo o dialisado (Adaptado de MELGAARD *et al.*, 2013).

Quando há igualdade na recuperação do fármaco por diálise e retrodiálise *in vitro* entende-se que o fármaco não se liga à membrana e tubulação das sondas, sendo possível utilizar-se a recuperação determinada por retrodiálise *in vivo* para determinar as reais concentrações teciduais (GONZALEZ; SCHMIDT e DERENDORF, 2013). No entanto, substâncias lipofílicas tendem a se ligar na tubulação da sonda e na membrana de microdiálise, levando a diferenças nas recuperações *in vitro* determinadas por diálise e retrodiálise. Nesses casos, pode-se empregar a modelagem matemática para estimar as concentrações livres teciduais do fármaco levando em consideração a taxa de ligação ao sistema (ARAUJO *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que entre as vantagens da técnica de microdiálise, está a redução do número de animais experimentais para a determinação da penetração tecidual de fármacos, a possível investigação do perfil de concentração temporal do fármaco por um longo período experimental e também a possibilidade de amostragem simultânea e quantificação de fármacos em diferentes órgãos (LANGE; DE BOER e BREIMER, 2000). Como desvantagens, no entanto, pode-se citar a dificuldade de avaliar fármacos lipofílicos que podem se ligar a tubulação do sistema; a possibilidade de coleta apenas de fármacos de baixo peso molecular; o fato de que as concentrações medidas representarem a concentração média do intervalo de coleta; e a possibilidade da inserção tecidual da sonda causar alterações no tecido estudado devido ao trauma e resposta inflamatória resultantes, que podem influenciar o experimento (LANGE; DE BOER e BREIMER, 2000).

Como exemplo de trabalhos que utilizam de microdiálise dérmica na quantificação de fármacos, cita-se o de Wan e colaboradores (2015) que realizaram estudo de dermatocinética utilizando sondas de microdiálise e observaram que os géis compostos por microemulsões contendo ácido pseudolárico B produziram maior concentração de fármaco livre e total na derme, quando comparado com o fármaco administrado disperso em gel. Em estudo realizado no mesmo ano Zhang e colaboradores (2015) produziram nanopartículas lipídicas sólidas contendo aconitina, e compararam a penetração dérmica do fármaco livre (tintura) e encapsulado através de microdiálise na derme abdominal de ratos. O estudo mostrou que as nanopartículas desenvolvidas aumentaram o poder de penetração do fármaco na derme 2,26 vezes.

Diante do exposto, podemos afirmar que trabalhos utilizando microdiálise dérmica são úteis na avaliação da penetração tecidual de fármacos e podem auxiliar na interpretação de seu efeito terapêutico. Desta forma, consideramos relevante realizar estudos de efeito terapêutico e de microdiálise dérmica comparando a formulação HQNC_{Caps} com o creme comercial no mercado farmacêutico e com o HQET_{Caps}.

O conteúdo presente nos tópicos materiais, métodos, resultados e discussão - *ainda não publicados* - foram excluídos nesta versão parcial da tese. Entretanto, foram inseridas a seguir as principais considerações dos conteúdos retirados. No total, foi suprimido o conteúdo presente em 75 páginas da versão total da tese.

Na seção de metodologia o texto suprimido continha a metodologia utilizada na produção das suspensões de nanocápsulas (deposição interfacial do polímero pré-formado) e as metodologias utilizadas na caracterização destes sistemas nanométricos (diâmetro de partícula, potencial zeta, pH das suspensões, eficiência de encapsulação, teor dos fármacos em suspensão, estabilidade e avaliação da presença de cristais de fármaco).

Em relação às formulações semissólidas foi suprimido o processo de produção dos hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados, bem como sua caracterização. Na caracterização dos hidrogéis e do creme comercial foi avaliado o pH das formulações, o diâmetro de partícula (quando produzido com suspensões de nanocápsulas), aspectos reológicos e doseamento dos capsaicinóides.

Na sessão de metodologia também foram suprimidos os diferentes protocolos utilizados nos estudos farmacodinâmicos. Esta sessão continha a metodologia de indução de neuropatia em camundongos suíços machos, os protocolos experimentais e, também, os testes de avaliação das formulações frente a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em camundongos suíços modelo de dor neuropática periférica e a análise estatística dos resultados.

Retirou-se o desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica para quantificação dos capsaicinóides via LC-MS/MS em amostras de microdialisado dérmico. Bem como, todos os ensaios de calibração das sondas de microdiálise dérmica, incluindo as técnicas de diálise e retrodiálise *in vitro*, estudos de ligação da dihidrocapsaicina a tubulação das sondas, e a calibração das sondas por retrodiálise *in vivo*.

Ainda em relação a metodologia, também foi sumprimido o delineamento dos estudos farmacocinéticos, o protocolo de pesquisa, análise histológica da pele dos animais, análises estatísticas e metodologia de quantificação da concentração total dos capsaicinóides na pele.

Quanto aos resultados de caracterização das suspensões de nanocápsulas foi visto que todas as formulações possuíam um perfil de distribuição nanométrico, sem a presença de contaminantes micrométricos, potencial zeta positivo, pH levemente ácido, teor de fármaco próximo de 100% e alta eficiência de encapsulação dos fármacos. A análise das formulações semissólidas mostrou que os hidrogéis apresentaram características adequadas para aplicação via tópica, mostrando características de sistemas não-newtonianos com comportamento pseudoplástico. O teor de fármaco para todas as formulações foi próximo entre si e isto possibilitou a comparação das formulações nos estudos dermatofarmacocinéticos e farmacodinâmicos.

Os ensaios farmacodinâmicos mostraram que a formulação HQNC_{Caps} apresentou características promissoras para o tratamento da dor neuropática periférica. O HQNC_{Caps} mostrou efeito frente a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica de maneira mais rápida que as outras formulações, e também manteve sua ação ao longo do experimento de avaliação antinociceptiva durante o tratamento dos animais. No experimento farmacodinâmico executado após a interrupção do tratamento dos animais, o HQNC_{Caps} apresentou características semelhantes ao creme comercial frente a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica.

A metodologia bioanalítica foi desenvolvida e validada possuindo características adequadas para a execução dos experimentos dermatofarmacocinéticos, mostrando alta sensibilidade para a quantificação da CAPS (0,5-100 ng/mL) e da D-CAPS (0,25-100 ng/mL). A calibração das sondas de microdiálise *in vitro* mostrou que há igualdade na recuperação das sondas por diálise e retrodiálise para a CAPS, enquanto que para a D-CAPS houve diferença nestes processos. Este fenômeno de ligação da D-CAPS a tubulação, tornou necessário à realização de estudos de modelagem matemática dos dados de calibração das sondas. Através da modelagem matemática dos dados, chegou-se ao valor real de recuperação da D-CAPS por diálise e retrodiálise – sendo estatisticamente iguais. Seguindo a isso, foi realizada a calibração *in vivo* das sondas e a execução dos experimentos de dermatofarmacocinética com as formulações.

As sondas de microdiálise foram comprovadamente inseridas na derme dos animais através de análise histológica. A concentração total dos fármacos

na pele foi igual ao final do experimento de microdiálise. No entanto, a concentração de capsaicinóides livre na derme abdominal dos ratos *wistar* foi superior quando os fármacos foram aplicados a partir da formulação HQNC_{Caps}, mostrando também um perfil de concentração livre dos fármacos sustentado e prolongado. Este diferente perfil de exposição dos fármacos quando aplicados a partir da formulação HQNC_{Caps}, garantiu a maior exposição dos capsaicinóides na derme dos animais quando aplicados a partir do HQNC_{Caps}. Estes resultados podem estar relacionados ao melhor efeito farmacológico da formulação HQNC_{Caps}.

5.8 Discussão Geral

O tratamento da DNP com as formulações contendo capsaicinóides disponíveis no mercado farmacêutico induz efeitos adversos significativos, destacando sensação de queimação local e eritema, fato que reduz a adesão dos pacientes ao tratamento e sua eficácia no alívio da dor. Com o objetivo de reduzir a incidência destes efeitos adversos e melhorar o efeito terapêutico dos ativos, Contri e colaboradores (2011) desenvolveram suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides. Diante de características físico-químicas consideradas adequadas para essa formulação, como tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão, alta eficiência de encapsulação e liberação prolongada dos fármacos, passou-se para nova etapa da pesquisa: a viabilização da aplicação destas formulações através da via tópica. Para isso, foi realizado estudo de desenvolvimento e otimização da formulação HQNC_{Caps}, associado a caracterização físico-química desses sistemas e análise estrutural do hidrogel (CONTRI 2010, 2013b). Foi verificado que o HQNC_{Caps} apresentou-se como sistema não-newtoniano de comportamento pseudoplástico. Além disso, o hidrogel promoveu a liberação gradual dos ativos e mostrou a presença de estruturas nanométricas em sua composição, a manutenção da estrutura das nanocápsulas no sistema. Todos estes resultados representam características físico-químicas e reológicas adequadas dos hidrogéis para aplicação através da via tópica, fato que permitiu dar continuidade a pesquisa.

Em estudo subsequente, Contri e colaboradores (2013a) comprovaram maior bioadesão da formulação HQNC_{Caps} à pele, quando comparado a um hidrogel de hidroxietilcelulose contendo nanocápsulas e a própria suspensão de nanocápsulas poliméricas. Além disto, a formulação HQNC_{Caps} também mostrou um alto poder de deposição dos capsaicinóides em derme e epiderme viável, sugerindo que a formulação poderia garantir melhor efeito farmacológico dos capsaicinóides, bem como redução de seus efeitos adversos. Essa redução de efeitos adversos foi comprovada em trabalho seguinte, destacando-se a redução de eritema e da sensação de queimação local quando os capsaicinóides foram administrados na formulação HQNC_{Caps} em comparação com a formulação creme comercial e hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides dissolvidos em solução etanólica (30% de etanol) (CONTRI *et al.*, 2014).

Seguindo este conjunto de resultados, executamos os experimentos descritos nesta tese. Primeiramente foi realizada a nanoencapsulação dos capsaicinóides em concentração intermediária (1,3 mg/mL) às concentrações utilizadas nos trabalhos de Contri e colaboradores, (2010; 2011; 2013a; 2014), que encapsularam 0,5 mg/mL e 3,0 mg/mL. Essa concentração de 1,3 mg/mL equivale, após a produção do hidrogel, à concentração dos fármacos presente no creme comercial. Após a produção e caracterização dessas formulações, foi demonstrada a reprodutibilidade das características físico-químicas das suspensões e do HQNC_{Caps}. Essa formulação HQNC_{Caps} 1,3 mg/mL foi utilizada para a investigação farmacocinética e farmacodinâmica.

Para avaliação farmacodinâmica foi induzida neuropatia em camundongos suíços através de ligação parcial do nervo ciático. Após esta indução, os animais foram tratados com as diferentes formulações: HQNC_{Caps}, creme comercial e HQET_{Caps}, na dose de 50 mg/dia administrada sob a pata traseira esquerda dos animais, lado onde foi induzida a neuropatia. Durante o estudo farmacodinâmico comprovou-se que a formulação HQNC_{Caps} foi a única que garantiu efeito terapêutico frente à hiperalgesia térmica e alodinia mecânica 6 h após sua primeira aplicação. Esse efeito se manteve ao longo do tratamento (96 h), o que não ocorreu para a formulação creme comercial e formulação HQET_{Caps}.

Em outro protocolo de pesquisa farmacodinâmico, que também foi realizado em modelo animal de DNP em camundongos suíços, foi avaliada a manutenção da atividade antinociceptiva da formulação HQNC_{Caps} e do creme comercial, em até 6 dias após a interrupção do tratamento que durou 96 h. Observou-se que tanto a formulação HQNC_{Caps} como a formulação creme comercial mantiveram a atividade antinociceptiva frente a hiperalgesia térmica por 6 dias após a interrupção do tratamento, sugerindo desfuncionalização persistente das fibras C após o tratamento com essas formulações. Na avaliação frente à alodinia mecânica, apenas a formulação HQNC_{Caps} apresentou efeito antinociceptivo significativo após 2 dias da interrupção do tratamento dos animais, quando comparada ao grupo controle, o que não ocorreu com o creme comercial.

Diante dos resultados de efeito farmacológico diferentes para as formulações avaliadas, propôs-se investigar o perfil de exposição dos

capsaicinóides livres na derme dos animais, região onde os fármacos exercem sua ação. Para verificar essa exposição realizou-se um estudo de dermatofarmacocinética empregando-se a microdiálise dérmica.

Para a execução do estudo de microdiálise dérmica, no entanto, fez-se necessário o desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica que permitisse a quantificação de capsaicinóides em microdialisado dérmico de ratos, utilizando solução de Ringer como meio de perfusão. O método foi desenvolvido utilizando a técnica de LC-MS/MS, quantificando-se simultaneamente a CAPS e a D-CAPS. O método mostrou-se rápido e específico, destacando-se o pequeno volume de injeção de amostras (2 μ L), bem como o baixo limite de quantificação dos capsaicinóides - 0,5 ng/mL para CAPS e 0,25 ng/mL para a D-CAPS. Esse método permitiu a execução dos experimentos de microdiálise dérmica e a calibração das sondas de microdiálise com concentrações próximas as encontradas na derme dos animais.

Na calibração das sondas de microdiálise dérmica *in vitro* foi verificada igualdade na recuperação relativa da CAPS obtida no processo de diálise e retrodiálise ao se utilizar o fluxo de perfusão de 0,5 μ L/min. Esse resultado permitiu utilizar os valores de recuperação relativa da CAPS, obtidos na calibração das sondas por retrodiálise *in vivo*, para determinar a concentração real da CAPS no tecido dérmico. Para a D-CAPS, no entanto, foi verificada diferença entre a recuperação do fármaco por diálise e retrodiálise *in vitro*. Essa diferença ocorreu devido à ligação da D-CAPS à tubulação de entrada das sondas de microdiálise. Para possibilitar a utilização da retrodiálise para calibração das sondas *in vivo* fez-se necessário modelar matematicamente os dados de recuperação da D-CAPS obtidos *in vitro*. A determinação do coeficiente de difusão da D-CAPS permitiu a determinação da real recuperação relativa desse fármaco por microdiálise e sua utilização para correção das concentrações livres intersticiais dérmicas obtidas *in vivo* para ambos os capsaicinóides.

Os experimentos de microdiálise dérmica mostraram um perfil de concentração dérmica livre de capsaicinóides sustentado, pelas 12 h do experimento, nos animais que receberam a formulação HQNC_{Caps}, o que não ocorreu com a formulação HQET_{Caps} e com a formulação creme comercial. Este perfil de concentração livre por tempo sustentado garantiu um aumento de 1,6

vezes na exposição dérmica à CAPS, D-CAPS e à soma dos capsaicinóides na derme dos animais, quando comparados às formulações creme comercial e HQET_{Caps}. Esses achados são importantes e explicam o melhor efeito terapêutico apresentado pela formulação HQNC_{Caps}, principalmente nas primeiras avaliações farmacodinâmicas.

O conjunto de resultados encontrados nesses estudos, portanto, indicam que a HQNC_{Caps} é uma formulação com potencial para melhorar o tratamento de pacientes que sofrem de DNP. Dessa maneira, considera-se importante dar continuidade aos estudos com a formulação HQNC_{Caps}, incluindo um estudo pormenorizado em humanos que sofrem de DNP, bem como estudos toxicológicos e de ajuste de dose, uma vez que essa pode potencialmente produzir um alívio rápido da dor em pacientes que sofrem desta condição neuropática.

6.1 Conclusões específicas:

6.1.1 Da produção e caracterização das formulações:

✓ As suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo capsaicinóides, mostraram-se com tamanho de partícula reduzido, com baixo índice de polidispersão, pH levemente ácido, potencial zeta positivo e alta eficiência de encapsulação dos fármacos.

✓ A formulação HQNC_{Caps} mostrou estruturas nanométricas, pH levemente ácido e comportamento não-newtoniano pseudoplástico, características adequadas para administração via tópica.

6.1.2 Do efeito terapêutico:

- *frente a hiperalgesia térmica :*

✓ A formulação HQNC_{Caps} apresentou efeito antinociceptivo nas avaliações de 6h; 24h; 48h e 96h após o início do tratamento dos animais, enquanto que o HQET_{Caps} e creme comercial apresentaram efeito nas avaliações 48h e 96h.

✓ As formulações HQNC_{Caps} e o creme comercial mantiveram seu efeito terapêutico frente a hiperalgesia térmica 6 dias após a interrupção do tratamento dos animais.

- *frente a alodínia mecânica:*

✓ A formulação HQNC_{Caps} apresentou efeito antinociceptivo nas avaliações de 6h; 24h; 48h e 96h após o início do tratamento dos animais. O creme comercial apresentou efeito 48h após o início do tratamento, enquanto que no tempo 96h seu resultado foi inconclusivo. O HQET_{Caps} mostrou efeito antinociceptivo na avaliação 96h.

✓ A formulação HQNC_{Caps} manteve seu efeito terapêutico frente a alodínia mecânica 2 dias após a interrupção do tratamento, o que não ocorreu com o creme comercial.

6.1.3 Da validação da metodologia bioanalítica:

✓ A metodologia bioanalítica desenvolvida mostrou ser linear, exata, precisa, específica e com alta sensibilidade para quantificação da capsaicina (no intervalo de concentração de 0,5 ng/ml a 100 ng/ml) e dihidrocapsaicina (no intervalo de concentração de 0,25 ng/ml a 100 ng/ml) em amostras de microdialisado dérmico obtidas utilizando solução de Ringer como meio de perfusão.

6.1.4 Do ensaio de microdiálise dérmica:

✓ Os perfis de concentração da CAPS e da D-CAPS livre em função do tempo não mostraram uma fase de eliminação bem definida mesmo após 12h de experimento quando aplicado a partir das diferentes formulações.

✓ A ASC_{0-12h} da CAPS, da D-CAPS e da soma dos capsaicinóides livres em função do tempo mostrou um aumento de 1,6 vezes ao ser administrada a partir da formulação $HQNC_{Caps}$ quando comparado com a formulação $HQET_{Caps}$ e o creme comercial, fato que pode estar correlacionado com o melhor efeito terapêutico desta formulação.

6.2 Conclusão geral:

✓ A formulação $HQNC_{Caps}$ mostrou a presença de partículas nanométricas e melhor efeito terapêutico frente a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica ao ser comparado com as formulações $HQET_{Caps}$ e ao creme comercial, promovendo também maior exposição dos capsaicinóides livres na derme dos animais, também ao ser comparada com as formulações $HQET_{Caps}$ e ao creme comercial. A formulação $HQNC_{Caps}$ mostra-se promissora no tratamento da DNP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.; WALSH, C.; VEALE, D.; BRESNIHAN, D.; FITZGERALD, O.; BARRY, M.. Understanding the relationship between the EQ-5D, SF-6D, HAQ and disease activity in inflammatory arthritis. **Pharmacoeconomics**, v. 28, n. 6, p. 477-487, 2010.

AGGARWAL, B.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; SUNG, B., ANAND, P.. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. **Planta Medica**, v. 74, n. 12, p. 1560-1569, 2008.

ALAM, M.I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBAR, M.. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, 2010.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C.. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ALMEIDA, M.A.; NADAL, J.M.; GRASSIOLLI, S.; PALUDO, K.S.; ZAWADZKIC, S.F.; CRUZ, L.; PAULA, J.P.; FARAGO, P.V.. Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 40, p. 345-356, 2014.

ALVES, P.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: Development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-904, 2005.

ALVES, MARTA PALMA. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro, 2006. 183f. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ANAND, P.; BLEY, K.. Topical capsaicin for pain management: Therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8 patch. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 4, p. 490-502, 2011.

ANDRADE, C.; ARAÚJO LOCK, G.; PIGATTO, M.C.; COSTA, T.D.; ARAÚJO, B.V.. Validation of LC-MS/MS method applied to evaluation of free tissue concentrations of vildagliptin in diabetic rats by microdialysis. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 12, p. 1722-1727, 2014.

ANDRIEUX, K.; COUVREUR, P.. Nanomedicine as a promising approach for the treatment and diagnosis of brain diseases: The example of Alzheimer's disease. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 71, n. 4, p. 225-233, 2013.

ARAUJO, B.V.; SILVA, C.F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 876-881, 2008.

ASTELLAS Pharma Europe Ltd. Summary of Product Characteristics: Qutenza 179 mg Cutaneous Patch. London, UK: European Medicines Agency; Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000909/WC500040453.

ATRUX-TALLAU, N.; DENIS, A.; PADOIS, K.; BERTHOLLE, V.; HUYNH, T.T.N.; HAFTEK, M.; FALSON, F.; PIROT, F.. Skin absorption modulation: Innovative non-hazardous technologies for topical formulations. **Open Dermatology Journal**, v. 4, n. 1, p. 3-9, 2010.

AU, W.L.; SKINNER, M.F.; BENFELDT, E.; VERBEECK, R.K.; KANFER, I. Application of Dermal Microdialysis for the Determination of Bioavailability of Clobetasol Propionate Applied to the Skin of Human Subjects. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 1, p. 17-24, 2011.

AZEREDO, F.J.; DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H.. Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: Current status and future directions. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 3, p. 205-212, 2014.

BACKONJA, M.; WALLACE, M.S.; BLONSKY, E.R.; CUTLER, B.J.; MALAN JR., P.; RAUCK, R.; TOBIAS, J. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind study. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 12, p. 1106-1112, 2008.

BARANIDHARAN, G.; DAS, S.; BHASKAR, A.. A review of the high-concentration capsaicin patch and experience in its use in the management of neuropathic pain. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, n. 5, p. 287-297, 2013.

BARON, R.. Mechanisms of disease: Neuropathic pain - A clinical perspective. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 2, p. 95-106, 2006.

BLAZKOVA, I.; SMERKOVA, K.; BLAZKOVA, L.; VACULOVICOVA, M.; STIBOROVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; BEKLOVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.. Doxorubicin interactions with bovine serum albumin revealed by microdialysis with on-line laser-induced fluorescence detection at subpicogram level. **Electrophoresis**, v. 36, n. 11-12, p. 1282-1288, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Dispõem sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RDC Nº27, de 22/05/2012, Guia para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

BENNETT, M.I.; RAYMENT, C.; HJERMSTAD, M.; AASS, N.; CARACENI, A.; KAASA, S.. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. **Pain**, v. 153 , n. 2, p. 359-365, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BERNARD, B.K.; TSUBUKU, S.; KAYAHARA, T.; MAEDA, K.; HAMADA, M.; NAKAMURA, T.; SHIRAI, Y.; NAKAYAMA, A.; UENO, S.; MIHARA, R.. Studies of the toxicological potential of capsinoids: X. Safety assessment and pharmacokinetics of capsinoids in healthy male volunteers after a single oral ingestion of CH-19 sweet extract. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. SUPPL. 3, p. 137-147, 2008.

BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A.M.O.. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1-3, p. 24-34, 2008.

BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; MENEGHETTI, A.; HOPPE, J.B.; BATTASTINI, A.M.O.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; SALBEGO, C.G. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 4927-4942, 2012.

BERNARDI, P.M.; BARRETO, F.; DALLA COSTA, T. Application of a LC–MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 340-345, 2017.

BERTRAND, H.; KYRIAZIS, M.; REEVES, K.D.; LYFTOGT, J.; RABAGO, D.. Topical Mannitol Reduces Capsaicin-Induced Pain: Results of a Pilot-Level, Double-Blind, Randomized Controlled Trial. **PM and R**, v. 7, n. 11, p. 1111-1117, 2015.

BOIVIE, J.; LEIJON, G.; JOHANSSON, I.. Central post-stroke pain - a study of the mechanisms through analyses of the sensory abnormalities. **Pain**, v. 37, n. 2, p. 173-185, 1989.

BOUTSIOUKI, P.; THOMPSON, J.P.; CLOUGH, G.F. Effects of local blood flow on the percutaneous absorption of the organophosphorus compound malathion:

A microdialysis study in man. **Archives of Toxicology**, v. 75, n. 6, p. 321-328, 2001.

BRIGO, F.; ROSSINI, F.; STEFANI, A.; TOCCO, P.; FIASCHI, A.; SALVIATI, A. Atypical presentation of thalamic post-stroke pain. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 1015-1017, 2013.

CAMPBELL, C.M.; KIPNES, M.S.; STOUCH, B.C.; BRADY, K.; KELLY, M.; SCHMIDT, W.K.; PETERSEN, K.L.; ROWBOTHAM, M.C.; CAMPBELL, J.N. Randomized control trial of topical clonidine for treatment of painful diabetic neuropathy. **Pain**, v. 153, n. 9, p. 1815-1823, 2012.

CARREÑO, F.; PAESE, K.; SILVA, C.M.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T.. Pharmacokinetic Investigation of Quetiapine Transport across Blood-Brain Barrier Mediated by Lipid Core Nanocapsules Using Brain Microdialysis in Rats. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 1289–1297, 2016.

CARTER, G.T.; DUONG, V.; HO, S.; NGO, K.C.; GREER, C.L.; WEEKS, D.L. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 457-470, 2014.

CHAIYASIT, K.; KHOVIDHUNKIT, W.; WITTAYALERTPANYA, S.. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in capsicum frutescens on decreasing plasma glucose level. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 92, n. 1, p. 108-113, 2009.

CHALLA, S.R. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 170-174 , 2015.

CHANDA, S.; BASHIR, M.; BABBAR, S.; KOGANTI, A.; BLEY, K.. In Vitro Hepatic and Skin Metabolism of Capsaicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 4, p. 670-675, 2008.

CHAURASIA, C.S.; MÜLLER, M.; BASHAW, E.D.; BENFELDT, E.; BOLINDER, J.; BULLOCK, R.; BUNGAY, P.M.; DELANGE, E.C.M.; DERENDORF, H.; ELMQUIST, W.F.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; JOUKHADAR, C.; KELLOGG, D.L.; LUNTE, C.E.; NORDSTROM, C. H.; ROLLEMA, H.; SAWCHUK, R.J.; CHEUNG, B.W.Y.; SHAH, V.P.; STAHL, L.; UNGERSTEDT, U.; WELTY, D.F.; YEO, H. AAPS-FDA workshop white paper: Microdialysis principles, application, and regulatory perspectives report from the joint AAPS-FDA workshop, November 4-5, 2005, Nashville, TN. **AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. Article number 6, 2007.

CHHABRA, N.; ASERI, M.L.; GOYAL, V.; SANKHLA, S. Capsaicin: A promising therapy - A critical reappraisal. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Disease**, v. 2, n. 1, p. 8-15, 2012.

CHOOLOCK, K.; SINGH, R.P.; SATHIRAKUL, K.; DERENDORF, H.. Dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol following topical administration of Zingiber cassumunar (plai) oil. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1761-1766, 2012.

CONTRI, R.V.; KATZER, T.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery. **Soft Materials**, v. 8, n. 4, p. 370-385, 2010.

CONTRI, R.V.; KAISER, M.; POLETTO, F.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2398-2406, 2011.

CONTRI, R. V.; KATZER, T.; OURIQUE, A. F.; SILVA, A. L. M.; BECK, R. C. R.; POHLMAN, A. R.; GUTERRES, S. S. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 820-830, 2013a.

CONTRI, R.V.; RIBEIRO, K.L.F.; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 7-8, p. 913-924, 2013b.

CONTRI, R.V.; FRANK, L.A.; KAISER, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 951-962, 2014.

CONTRI, R.V.; FIEL, L.A.; ALNASIF, N.; POHLMAN, A.R.; GUTERRES, S.S.; SCHÄFER-KORTING, M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 507, n. 1-2, p. 12-20, 2016.

DE BRUM, T.L., FIEL, L.A., CONTRI, R.V., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773-780, 2015.

DE LOURDES REYES-ESCOGIDO, M.; GONZALEZ-MONDRAGON, E.G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E.. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1253-1270, 2011.

DE MORAES V. É.B.; GARCIA, J.B.S.; DA SILVA, A.A.M.; MUALEM A.R.L.T.; JANSEN, R.C.S.. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 44, n. 2, p. 239-251, 2012.

DE-SOUSA LOBATO, K.B.; PAESE, K.; FORGEARINI, J.C.; GUTERRES, S.S.; JABLONSKI, A.; DE OLIVEIRA RIOS, A. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906–3912, 2013.

DERRY, S.; MOORE, R.A.. Topical capsaicin (low concentration) for chronic neuropathic pain in adults. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, v. 9, p. CD010111, 2012.

DERRY, S.; SVEN-RICE, A.; COLE, P.; TAN, T.; MOORE, R.A.. Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 2, p. CD007393, 2013.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, 2000.

DESAI, P.; PATLOLLA, R.R.; SINGH, M.. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

DESAI, P.R.; SHAH, P.P.; PATLOLLA, R.R.; SINGH, M.. Dermal microdialysis technique to evaluate the trafficking of surface-modified lipid nanoparticles upon topical application. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 9, p. 2587-2600, 2012.

DESMET, E.; VAN GELE, M.; LAMBERT, J. Topically applied lipid- and surfactant-based nanoparticles in the treatment of skin disorders. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, n. 1, p. 109-122, 2017.

DOMB, ABRAHAM J.; TABATA, YASUHIKO; KUMAR, M. N. V. RAVI; FARBER, S.. Nanoparticles for pharmaceutical applications. 1. ed. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2007.

DOMINGUES, G.S.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.. Nanocapsule-coated microparticles prepared in one step: Characterization and in vitro drug release profiles evaluation. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 1678-7064, 2008.

DÖMÖTÖR, A.; KERESKAY, L.; SZEKERES, GY.; HUNYADY, B.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, GY. Participation of capsaicin-sensitive afferent nerves in the gastric mucosa of patients with Helicobacter pylori-positive or-negative chronic gastritis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 2, p. 411-417, 2007.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; NAHAR, M.; JAIN, V.; JAIN, N.K. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 590-596, 2010.

DYVEKE, T.D.; KAREN, L.; NANNA, B.F.; JAN, V.; CHRISTOPH, M.; MARTHA, S.S.; JENSEN, T.S.; SØREN H.S. Pain relief with lidocaine 5% patch in localized peripheral neuropathic pain in relation to pain phenotype: a randomised, double-blind, and placebo-controlled, phenotype panel study. **Pain**, v. 156, n. 11, p. 2234-44., 2015.

EIJKELKAMP, N.; HEIJNEN, C.J.; WILLEMEN, H.L.D.M.; DEUMENS, R.; JOOSTEN, E.A.J.; KLEIBEUKER, W.; DEN HARTOG, I.J.M.; VAN VELTHOVEN, C.T.J.; NIJBOER, C.; NASSAR, M.A.; DORN II, G.W.; WOOD, J.N.; KAVELAARS, A.. GRK2: A novel cell-specific regulator of severity and duration of inflammatory pain. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 2138-2149, 2010.

EISENBERG, E.; RIVER, Y.; SHIFRIN, A.; KRIVOY, N.. Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. **Drugs**, v. 67, n. 9, p. 1265-1289, 2007.

FDA. Food and Drug Administration; Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.

ERDO, F.; HASHIMOTO, N.; KARVALY, G.; NAKAMICHI, N.; KATO, Y.. Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. A review. **Journal of Controlled Release**, v. 233, p. 147-161, 2016.

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

FIEL, L.A.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; NETZD, P.A.; POHLMANN, A.R. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: A quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, n. 20, p. 93–104, 2013.

FIEL, L.A.; CONTRI, R.V.; BICA, J.F.; FIGUEIRÓ, F.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 233–244, 2014.

FINE, P.G.; ROSENFELD, M.J. The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. **Rambam Maimonides Med J.**, v. 4, n. 4, p. e0022. , 2013.

FLORES, F.C.; DE LIMA, J.A.; DA SILVA, C.R.; BENVEGNÚ, D.; FERREIRA, J.; BURGER, M.E.; BECK, R.C.R.; ROLIM, C.M.; ROCHA, M.I.U.M.; DA VEIGA, M.L.; DA SILVA, C.D.B. Hydrogels Containing Nanocapsules and Nanoemulsions of Tea Tree Oil Provide Antiedematogenic Effect and Improved Skin Wound Healing. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 800-809, 2015.

FONTANA, M.C.; REZER, J.F.P.; CORADINI, K.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 241–249, 2011.

FORCHIELLI, M.L.; BONOLI, A.; PREITE, I.; PUGGIOLI, C.; BERSANI, G.. Parenteral nutrition admixtures for pediatric patients compounded with highly refined fish oil-based emulsion: Assessment of physicochemical stability. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 1127-1131, 2014.

FRANK, L.A.; SANDRI, G.; D'AUTILIA, F.; CONTRI, R.V.; BONFERRONI M.C.; CAMELLA, C.; FRANK, A.G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: A new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3151-3161, 2014.

FRERICK, H.; KEITEL, W.; KUHN, U.; BREDEHORST, A.; KUHLMANN, M. Topical treatment of chronic low back pain with a capsicum plaster. **Pain**, v. 106, n. 1-2, p. 59-64, 2003.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131-1136, 2008.

FROZZA, R.L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J.B.; SILVA, T.; BATTASTINI, A.M.O.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S.S.; SALBEGO, C.. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

GAO, Q.; ZHAO, Y.; YU, J.; YANG, T.; ZHU, Z.; DING, P.. Microdialysis as a tool to determine the skin concentration of mometason furoate in rats. **Pharmazie**, v. 69, n. 11, p. 787-791, 2014.

GARCIA, X.; ESCRIBANO, E.; COLOM, H.; DOMENECH, J.; QUERALT, J.. Tricyclic Antidepressants-loaded Biodegradable PLGA Nanoparticles: In Vitro Characterization and In Vivo Analgesic and Anti-Allodynic Effect. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 3, p. 345-353, 2011.

GÁRCIA-LOPEZ, R.; RONDERO-GANEM, A. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Abilit. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 5, n. 2, p. 62-72, 2015.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T.. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 4, p. 532-545, 2015.

GONZALEZ, D.; SCHMIDT, S.; DERENDORF, H. Importance of relating efficacy measures to unbound drug concentrations for anti-infective agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 274-288, 2013.

GREEN, D.P.; RUPAREL, S.; GAO, X.; RUPAREL, N.; PATIL, M.; AKOPIAN, A.; HARGREAVES, K.M. Central activation of TRPV1 and TRPA1 by novel

endogenous agonists contributes to mechanical and thermal allodynia after burn injury. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1-9, 2016.

GU, H.; LIU, G.; WANG, J.; AUBRY, A.-F.; ARNOLD, M.E.. Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay perf. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 18, p. 8959-8966, 2014.

GUPTA, S.; MOULIK, S.P.. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p. 22-45, 2008.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

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

HADDAD, L.B.; PHILPOTT-JONES, S.; SCHONFELD, T.. Contraception and prevention of HIV transmission: A potential conflict of public health principles. **Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**, v. 41, n. 1, p. 20-23, 2015.

HALL, G.C.; MORANT, S.V.; CARROLL, D.; GABRIEL, Z.L.; MCQUAY, H.J.. An observational descriptive study of the epidemiology and treatment of neuropathic pain in a UK general population. **BMC Family Practice**, v. 14, n. 28, p. 1-10, 2013.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.

HAYMAN, M.; KAM, P.C.A.. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 19, n. 5-6, p. 338-343, 2008.

HOFBAUER, R.K.; RAINVILLE, P.; DUNCAN, G.H.; BUSHNELL, M.C.. Cortical Representation of the Sensory Dimension of Pain. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, n. 1, p. 402-411, 2001.

HOFFMEISTER, C.R.D.; DURLI, T.L.; SCHAFFAZICK, S.R.; RAFFIN, R.P.; BENDER, E.A.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: A formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, p. 1-24, 2012.

HUDSON, L.J.; BEVAN, S.; WOTHERSPOON, G.; FOX, A.; WINTER, J.. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 2105-2114, 2001.

HURTADO, K. F.; LAUREANO, J.V.; DE A. LOCK, G.; DERENDORF, H.; DALLA COSTA, T. Enhanced penetration of moxifloxacin into rat prostate tissue evidenced by microdialysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 327-333, 2014.

IASP. CLASSIFICATION OF CHRONIC PAIN: DESCRIPTORS OF CHRONIC PAIN SYNDROMES AND DEFINITIONS OF PAIN TERMS; DISPONÍVEL EM: ACESSOEM 29 JAN. 2014.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), 2005.

JAGGI, A.S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1-28 , 2011.

JAKEN, R.J.P.; JOOSTEN, E.A.J.; KNÜWER, M.; MILLER, R.; VAN DER MEULEN, I.; MARCUS, M.A.E.; DEUMENS, R. Synaptic plasticity in the substantia gelatinosa in a model of chronic neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 469, n. 1, p. 30-33, 2010.

JANCSÓ, G.; DUX, M.; OSZLÁCS, O.; SÁNTHA, P. Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1139–1141. , 2008.

JENSEN, L.B.; PETERSSON, K.. Composition comprising lipid nanoparticles and a corticosteroid or vitamin d derivative. **US 20140079785 A1**, 2014.

JOHANSEN, A.; ROMUNDSTAD, L.; NIELSEN, C.S.; SCHIRMER, H.; STUBHAUG, A.; JOHANSEN, A.; ROMUNDSTAD, L.; NIELSEN, C.S.; SCHIRMER, H.; STUBHAUG, A. Persistent postsurgical pain in a general population: Prevalence and predictors in the Tromsø study. **Pain**, v. 153, n. 7, p. 1390-1396, 2012.

JÁNOS SZOLCSÁNYI. **Capsaicin as a Therapeutic Molecule**, 2014. p.22.

JOSHI, A.; STAGNI, G.; CLEARY, A.; PATEL, K.; WEISS, D.S.; HAGINS, M.. Iontophoresis successfully delivers dexamethasone sodium phosphate to dermis as measured by microdialysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 191-196, 2014.

KAISER, M.; PEREIRA, S.; POHL, L.; KETELHUT, S.B; KEMPER, B.; GORZELANNY, C; GALLA, H.J.; MOERSCHBACHER, B.M.; GOYCOOLEA, F.M.. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. 10048, 2015.

KEITEL, W.; FRERICK, H.; KUHN, U.; SCHMIDT, U.; KUHLMANN, M.; BREDEHORST, A. Capsicum pain plaster in chronic non-specific low back pain. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 51, n. 11, p. 896-903., 2001.

KERN, K.-U.; ENGLAND, J.; ROTH-DANIEK, A.; WAGNER, T. Is physician supervision of the capsaicin 8% patch administration procedure really necessary? An opinion from health care professionals. **Journal of Pain Research**, v. 6, p. 571-575, 2013.

KERR, B.; BENSON, C.; MIFFLIN, K.; JESUDASAN, S.J.B; DURSUN, S.; BAKER, G. Treatment of pain with antidepressants. **Klinik Psikofarmakoloji Bulteni**, v. 25, n. 3, p. 209-320, 2015.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T.. Patofisiologia da dor [Pathophysiology of pain]. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOLEVA GUDEVA, L.; MITREV, S.; MAKSIMOVA, V.; SPASOV, D.. Content of capsaicin extracted from hot pepper (*Capsicum annum* ssp. *microcarpum* L.) and its use as an ecopesticide. **Hemijaska Industrija**, v. 67, n. 4, p. 671-675, 2013.

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S99-S121, 2002.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L.. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Practice**, v. 14, n. 7, p. 656-667, 2014.

LALANI, J.; PATIL, S.; KOLATE, A.; LALANI, R.; MISRA, A.. Protein-Functionalized PLGA Nanoparticles of Lamotrigine for Neuropathic Pain Management. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 2, p. 413-427 , 2015.

LANGE, E.C.M.; DE BOER, A.G.; BREIMER, D.D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 2-3, p. 125-148, 2000.

LANGE, E.C.M.; Recovery and Calibration Techniques: Toward Quantitative Microdialysis. In: Müller M (ed) *Microdialysis in drug development*. Springer, New York, 2013. p. 13–31.

LARMÉNÉ-BELD, K.H.M.; VRIES-KOENJER, M.-T.L.M.; HORST, P.G.J.TER.; HOSPES, W. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of flucloxacillin and cloxacillin in microdialysis samples. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 8, p. 1096-1101, 2014.

LENZ, Q.F.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.; ALVES, M.P. Semi-solid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules showed in-vivo

anti-inflammatory activity in chronic arthritis and fibrovascular tissue models. **Inflammation Research**, v. 61, n. 4, p. 305-310, 2012.

LEWIS, G.N.; RICE, D.A.. Chronic pain: We should not underestimate the contribution of neural plasticity. **Critical Reviews in Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 51-86, 2014.

LIMA, C.K.F.; SILVA, R.M.; LACERDA, R.B.; SANTOS, B.L.R.; SILVA, R.V.; AMARAL, L.S.; QUINTAS, L.E.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; GUIMARAES, M.Z.P.; MIRANDA, A.L.P.. LASSBio-1135: A dual TRPV1 antagonist and anti-TNF-alpha compound orally effective in models of inflammatory and neuropathic pain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99510, 2014.

LINDBERGER, M.; TOMSON, T.; STÅHLE, L.. Microdialysis sampling of carbamazepine, phenytoin and phenobarbital in subcutaneous extracellular fluid and subdural cerebrospinal fluid in humans: An in vitro and in vivo study of adsorption to the sampling device. **Pharmacology and Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 158-165, 2002.

LINDQVIST, A.; JANSSON, B.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Quantitative analysis of the opioid peptide DAMGO in rat plasma and microdialysis samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 900, n. 1, p. 11-17, 2012.

LIU, M.; MAX, M.B.; ROBINOVITZ, E.; GRACEY, R.H.; BENNETT, G.J.. The human capsaicin model of allodynia and hyperalgesia: Sources of variability and methods for reduction. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 16, n. 1, p. 10-20, 1998.

LOWE, N.K. The nature of labor pain. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 5 SUPPL., p. pp. S16-S24, 2002.

MA, X.-L.; ZHANG, F.-X.; DONG, F.; BAO, L.; ZHANG, X.. Experimental evidence for alleviating nociceptive hypersensitivity by single application of capsaicin. **Molecular Pain**, p. 1-10, 2015.

MAIZELS, M.; MCCARBERG, B.. Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. **American Family Physician**, v. 71, n. 3, p. 483-490, 2005.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 2, p. 215-228, 2005.

MELGAARD, L.; HERSINI, K.J.; GAZERANI, P.; PETERSEN, L.J.. Retrodialysis: A review of experimental and clinical applications of reverse microdialysis in the skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 3, p., 2013.

MENDLIK, M.T.; URITSKY, T.J.. Treatment of Neuropathic Pain. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 17, n. 12, p. 50, 2015.

MILLAN, M.J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MORAES, C.M.; DE MATOS, A.P.; DE LIMA, R.; ROSA, A.H.; DE PAULA, E.; FRACETO, L.F.. Initial development and characterization of PLGA nanospheres containing ropivacaine. **Journal of Biological Physics**, v. 35, n. 5-6 SPECL.ISSUE, p. 455-461, 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P.. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 182-194, 2013.

NOLANO, M.; SIMONE, D.A.; WENDELSCHAFER-CRABB, G.; JOHNSON, T.; HAZEN, E.; KENNEDY, W.R. Topical capsaicin in humans: Parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. **Pain**, v. 81, n. 1-2, p. 135-145, 1999.

OKURA, D.; HORISHITA, T.; UENO, S.; NOBUYUKI, Y.; YUKA, S.; UEZONO, Y.; SATA, T. The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 in xenopus oocytes. **Anesthesia and Analgesia**, v. 118, n. 3, p. 554-562, 2014.

ONOFRE, A.N.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. Dor: principios e prática,. **2009. p. 319-325.**

PANDAV, S.; NAIK. J.. Preparation and In Vitro Evaluation of Ethylcellulose and Polymethacrylate Resins Loaded Microparticles Containing Hydrophilic Drug. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2014, n. 2014, 2014.

PAPANAS, N.; ZIEGLER, D. Emerging drugs for diabetic peripheral neuropathy and neuropathic pain, v. 21, n. 4, p. 393-407, 2016.

PAPOIU, A.D.; YOSIPOVITCH, G.. Topical capsaicin. the fire of a 'hot' medicine is reignited. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, n. 8, p. 1359-1371, 2010.

PARK, C.-K.; XU, Z.-Z.; LIU, T.; LIU, T.; SERHAN, C.N., JI, R.-R. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: Distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 50, p. 18433-18438, 2011.

PERGOLIZZI, J.; AHLBECK, K.; ALDINGTON, D.; COLUZZI, F.; DAHANG, A.; HUYGENH, F.; KOCOT-KęPSKAI, M.; MANGASJ, A.C.; MAVROCORDATOSK, P.; MORLIONL, B.; MÜLLER-SCHWEFEM, G.; NICOLAU, A.; SCHÄFER, M.; VARRASSI, G.. The development of chronic pain: Physiological CHANGE necessitates a multidisciplinary approach to treatment. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. 9, p. 1127-1135, 2013.

PERSHING, L.K.; REILLY, C.A.; CORLETT, J.L.; CROUCH, D.J.. Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, n. 1, p. 73-81, 2004.

POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C.D.G.; CRUZ, L., BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A.M.O.; SILVEIRA, N. P. DA ;GUTERRES, S.S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1-1, p. 288-293 , 2008.

PIGATTO, M.C.; MOSSMANN, D.L.; COSTA, T.D.. HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: Application to pharmacokinetic studies. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 4, p. 529-536, 2015.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1-2, p. 53-61, 2002.

POHLMANN, A.R.; DETONI, C.B.; PAESE, K.; CORADINI, K.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Polymeric nanocapsules for topical delivery. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers**, p. 201-221, 2016.

POLETTI, F.S.; DE OLIVEIRA, C.P.; WENDER, H.; REGENT, D.; DONIDA, B.; TEIXEIRA, S.R.; GUTERRES, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R. How Sorbitan Monostearate Can Increase Drug-Loading Capacity of Lipid-Core Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** , v. 15, p. 827-837, 2015.

POMONIS, J.D.; HARRISON, J.E.; MARK, L.; BRISTOL, D.R.; VALENZANO, K.J.; WALKER, K.. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1 (2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropath. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 387-393, 2003.

- PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; SOYER, H.P.; ROBERTS, M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.
- RALSTON, D.D. Present models of neuropathic pain. **Pain Reviews**, v. 5, n. 2, p. 83-100, 1998.
- RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167–185, 2016.
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S.. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.
- RAZA, K.; SHAREEF, M.A.; SINGAL, P.; NEGI, P.; KATARE, O.P. Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompatible topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation. **Journal of Liposome Research**, v. 24, n. 4, p. 290-296, 2014.
- REDA, H.; GREENE, K.; RICE, F.L.; ROWBOTHAM, M.C.; PETERSEN, K.L. Natural history of herpes zoster: Late follow-up of 3.9 years (n = 43) and 7.7 years (n = 10). **Pain**, v. 154, n. 10, p. 2227-2233, 2013.
- REILLY, C.A.; CROUCH, D.J.; YOST, G.S.; FATAH, A.A. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 259-267, 2001.
- RICE, A.S.C.; FARQUHAR-SMITH, W.P.; NAGY, I. Endocannabinoids and pain: Spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, n. 2-3, p. 243-256, 2002.
- RICE, A.S.C.; DWORKIN, R.H.; MCCARTHY, T.D.; ANAND, P.; BOUNTRA, C.; MCCLOUD, P.I.; HILL, J.; CUTTER, G.; KITSON, G.; DESEM, N.; RAFF, M.. EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial, v. 383, n. 9929, p. 1637–1647, 2014.
- ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.D.S.; SAKATA, R.K.. Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central | [Pain: Current aspects on peripheral and central sensitization]. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.
- SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; MORI, M.; CAMELLA, C. Opportunities offered by chitosan-based nanotechnology in

mucosal/skin drug delivery. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 401-412, 2015.

SANTOS, A.B.O.; GOZZANI, J.L.. Acupuntura como tratamento coadjuvante na síndrome talâmica: Relato de caso [Acupuncture as adjuvant therapy in thalamic syndrome: Case report]. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 1, p. 88-94, 2011.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATTIAZZI, J.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1389-1394, 2013.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F.. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 560-575, 2010.

SAWYNOK, J.. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2003.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y.. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SAWYNOK, J. Topical analgesics for neuropathic pain: Preclinical exploration, clinical validation, future development. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 18, n. 4, p. 465-481, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A.R.;FREITAS, L.D.L.;GUTERRES, SS). Characterization and stability evaluation of diclofenac-loaded polymeric nanocapsules and nanospheres. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; DE LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A.R.. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHOLTEN, P.M.; HARDEN, R.N.. Assessing and Treating Patients With Neuropathic Pain. **PM and R**, v. 7, n. 11, p. S257-S269, 2015.

SHARMA, S.K.; VIJ, A.S.; SHARMA, M.. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1-3, p. 55-62, 2013.

SIMPSON, D.M.; ESTANISLAO, L.; BROWN, S.J.; SAMPSON, J.. An Open-Label Pilot Study of High-Concentration Capsaicin Patch in Painful HIV Neuropathy. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 35, n. 3, p. 299-306, 2008.

SINDRUP, S.H.; OTTO, M.; FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 6, p. 399-409, 2005.

SMITH, B.H.; TORRANCE, N.. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Current Pain and Headache Reports**, v. 16, n. 3, p. 191-198, 2012.

SONG, J.D.; KIM, D.W.; Matrix-type transdermal drug delivery system and preparation method thereof. **US 8404277 B2** (2013).

SORGE, R.E.; MAPPLEBECK, J.C.S.; ROSEN, S.; BEGGS, S.; TAVES, S.; ALEXANDER, J.K.; MARTIN, L.J.; AUSTIN, J.; SOTOCINAL, S.G.; CHEN, D.; YANG, M.; SHI, X.Q.; HUANG, H.; PILLON, N.J.; BILAN, P.J.; TU, Y.; KLIP, A.; JI, R.; ZHANG, J.;SALTER, M.W.; MOGIL, J.S. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081-1083, 2015.

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (United Kingdom)**, v. 31, n. 2, p. 49-53, 2013.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K.. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, n. 5, p. 682-691, 2010.

TAN, S.; GAO, B.; TAO, Y.; GUO, J.; SU, Z.-Q.. Antiobese effects of capsaicin-chitosan microsphere (CCMS) in obese rats induced by high fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1866-1874, 2014.

TASSO, L.; BETTONI, C.C.; OLIVEIRA, L.K.; COSTA, T.D. Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1-2, p. 96-101, 2008.

TEIXEIRA, M.J.; DE SOUZA, E.C.; YENG, L.T.; PEREIRA, W.C.. A lesão do trato de lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por avulsão de raízes do plexo braquial | [DREZ lesions and electrical stimulation of t. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 1, p. 56-62, 1999.

TETTEY-AMLALO, R.N.O.; KANFER, I.; SKINNER, M.F.; BENFELDT, E.; VERBEECK, R.K.. Application of dermal microdialysis for the evaluation of bioequivalence of a ketoprofen topical gel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2-3, p. 219-225, 2009.

THAKUR, S.; SRIVASTAVA, N. An update on neuropathic pain models. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 6, p. 11-16, 2016.

TORRANCE, N.; LAWSON, K.D.; AFOLABI, E.; BENNETT, M.; SERPELL, M.G.; DUNN, K.M.; SMITH, B.H. Estimating the burden of disease in chronic pain with and without neuropathic characteristics: Does the choice between the EQ-5D and SF-6D matter? **Pain**, v. 155, n. 10, p. 1996-2004, 2014.

UNGERSTEDT, U. Microdialysis - Principles and applications for studies in animals and man. **Journal of Internal Medicine**, v. 230, n. 4, p. 365-373, 1991.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654-662, 2014.

VINIK, A.; ROSENSTOCK, J.; SHARMA, U.; FEINS, K.; HSU, C.; MERANTE, D. Efficacy and safety of mirogabalin (DS-5565) for the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: A randomized, double-blind, placebo- and active comparator-controlled, adaptive proof-of-concept phase 2 study. **Diabetes Care**, v. 37, n. 12, p. 3253-3261, 2014.

VON H.C.; BARON, R.; WOOLF, C.. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

VOTRUBEC, M.; THONG, I.. Neuropathic pain: A management update. **Australian Family Physician**, v. 42, n. 3, p. 92-97, 2013.

WAGNER, T.; POOLE, C.; ROTH-DANIEK, A.. The capsaicin 8% patch for neuropathic pain in clinical practice: A retrospective analysis. **Pain Medicine (United States)**, v. 14, n. 8, p. 1202-1211, 2013.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A.R.; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R.J.; BOVY, A.G.. Secondary metabolites of Capsicum species and their importance in the human diet. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 783-793, 2013.

WAN, T.; XU, T.; PAN, J.; ZANG, G.; WU, C.; XU, Y.. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1-2, p. 111-120, 2015.

WANG, D.; MENG, F.; YU, L.; SUN, L.; SUN, L.; GUO, J.. A sensitive LC-MS/MS method for quantifying capsaicin and dihydrocapsaicin in rabbit plasma and tissue: Application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 4, p. 496-503, 2015.

WATSON, C.P.N.. Topical capsaicin as an adjuvant analgesic. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 9, n. 7, p. 425-433, 1994.

WEI, Y.; GUAN, J.; MA, X.; ZHONG, T.; MA, J.; LI, F.. Effect of glycyrrhizic acid on rhin renal penetration: A microdialysis study in rats. **Xenobiotica**, v. 45, n. 12, p. 1116-1121, 2015.

WIFFEN, P.J.; DERRY, S.; MOORE, R.A.; ALDINGTON, D.; COLE, P.; LUNN, M.P.; HAANPAA, M.; KALSO, E.A. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 11, p. CD010567, 2013.

WIKLUND, I.; HOLMSTROM, S.; STOKER, M.; WYRWICH, K.W.; DEVINE, M. Are treatment benefits in neuropathic pain reflected in the self assessment of treatment questionnaire? **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2013.

WOLF, S.; BARTON, D.; KOTTSCHADE, L.; GROTHEY, A.; LOPRINZI, C.. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 11, p. 1507-1515, 2008.

WOOLF, C.J.; MA, Q.. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J.. Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

YOU, Y.; UBOH, C.E.; SOMA, L.R.; GUAN, F.; TAYLOR, D.; LI, X.; LIU, Y., CHEN, J.. Validated UHPLC-MS-MS method for rapid analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in equine plasma for doping control. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 122-132, 2013.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; OLIVEIRA, C.M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A.M.O.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; FORCELINI, C.M.; BECK, R.C.R.; MOREIRA, J.C.F.. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 2, p. 156-167, 2013.

ZHANG, Q.; HU, J.; SHENG, L.; LI, Y.. Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 24, p. 2292-2297, 2010.

ZHANG, K.; RAMAMURTHY, S.; PRIHODA, T.J.; ECKMANN, M.S.. Effect of delayed intrathecal administration of capsaicin on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Journal of Pain Research**, v. 7, n. 11, p. 547-554, 2014.

ZHANG, Y.-T.; HAN, M.-Q.; SHEN, L.-N.; ZHAO, J.-H.; FENG, N.-P. Solid lipid nanoparticles formulated for transdermal aconitine administration and evaluated In Vitro and In Vivo. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 2, p. 351-361, 2015.

ZHOU, W.; HE, S.; YANG, Y.; JIAN, D.; CHEN, X.; DING, J.. Formulation, characterization and clinical evaluation of propranolol hydrochloride gel for

transdermal treatment of superficial infantile hemangioma. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 47, n. 7, p. 1109-1119, 2015.

ZHUANG, L.; XIA, H.; GU, Y.; DERENDORF, H.; LI, Y.; LIU, C. Theory and application of microdialysis in pharmacokinetic studies. **Current Drug Metabolism**, v. 16, n. 10, p. 919-931, 2015.

ZIMMERMANN, E.S.; TORRES, B.G.S.; DALLA COSTA, T. Validation of a sensitive HPLC/fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 3, p. 330-336, 2016.

ZOU, P.; YANG, X.; WANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, G.. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 1174–1181, 2016.

8.1 Validação parcial de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de CAPS e D-CAPS

Para as análises que determinaram o teor de capsaicinóides nas suspensões de nanocápsulas, assim como nos hidrogéis e no creme comercial utilizado no estudo, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência e o método desenvolvido por Contri e colaboradores (2011). A validação parcial da metodologia, que verifica a competência analítica de um método anteriormente desenvolvido, pode ser realizada segundo a RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010 utilizando como parâmetros a especificidade, linearidade, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária). O comprimento de onda de detecção foi de 280 nm, vazão de 0,75 mL/min e coluna de (250 x 4,6 mm, 5,0 µm) (Phenomenex®). A fase móvel (FM) isocrática, constituiu-se de uma mistura de acetonitrila:água (70:30), com pH ajustado a 4,5 com solução de ácido acético 2%, foi filtrada através de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,45 µm, sob vácuo e sonicada.

A especificidade do método para quantificação de CAPS e D-CAPS foi realizada através da obtenção e comparação dos cromatogramas obtidos a partir da dispersão e dissolução das suspensões de nanocápsulas contendo os capsaicinóides, com os cromatogramas obtidos a partir da dispersão e dissolução das suspensões de nanocápsulas sem os fármacos nas mesmas condições. Os cromatogramas obtidos na análise destas suspensões estão apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente e pode-se observar que o método demonstrou especificidade para quantificação da CAPS e D-CAPS, uma vez que não houve interferência cromatográfica de nenhum excipiente da formulação.

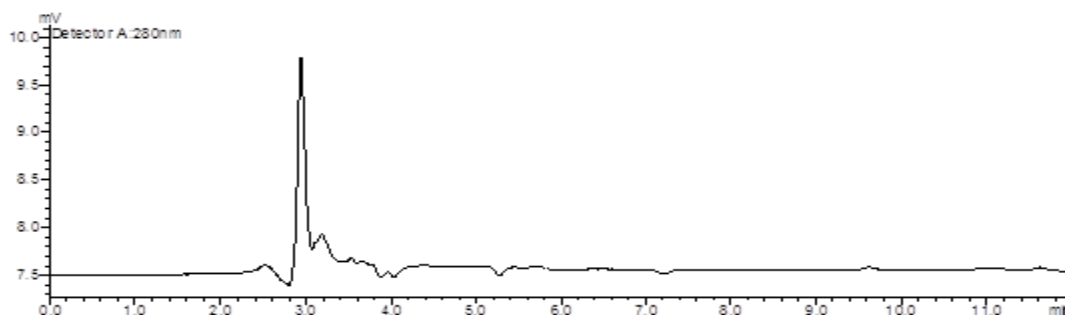


Figura 3. Cromatograma da diluição e dissolução das NCB. Pode-se verificar que não há presença de pico, o que confirma a especificidade de pico para a capsaicina e dihidrocapsaicina na figura posterior.

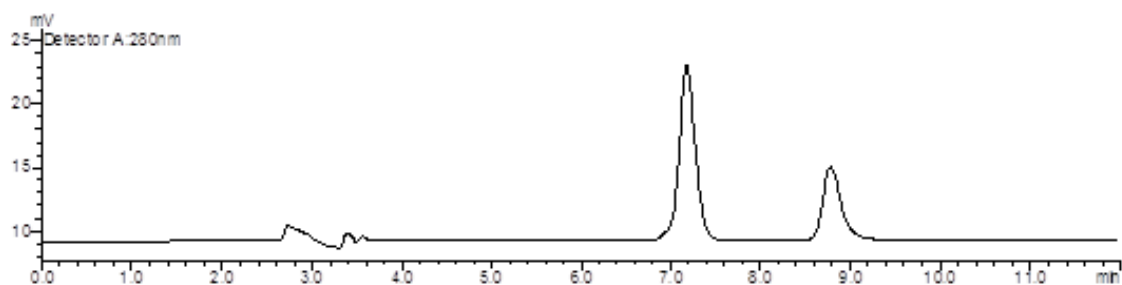


Figura 4. Cromatograma da Capsaicina e dihidrocapsaicina na concentração de 10 e 5 µg/mL, respectivamente.

No ensaio de linearidade foram preparadas diluições das substâncias para a construção de três curvas de calibração, na concentração de 0,3; 0,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 30 µg/mL para CAPS e de 0,150; 0,250; 5,0; 10,0; e 15 µg/mL para a D-CAPS. A equação da reta foi obtida através de estudos de regressão linear, entre a concentração dos fármacos e suas respectivas áreas. Neste processo de quantificação simultânea dos fármacos obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9999 para a CAPS e 0,9998 para a D-CAPS, demonstrando a linearidade do método, conforme exposto nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

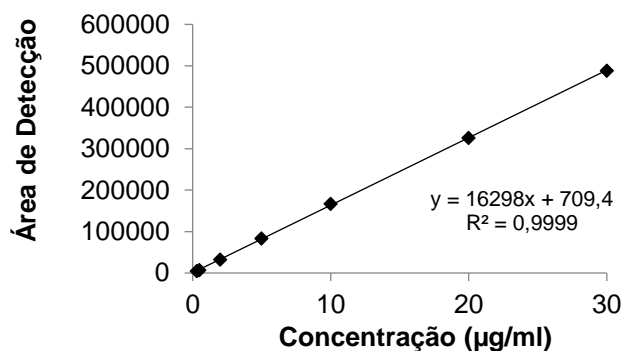


Figura 5. Representação gráfica da média das curvas padrão da capsaicina no ensaio de linearidade.

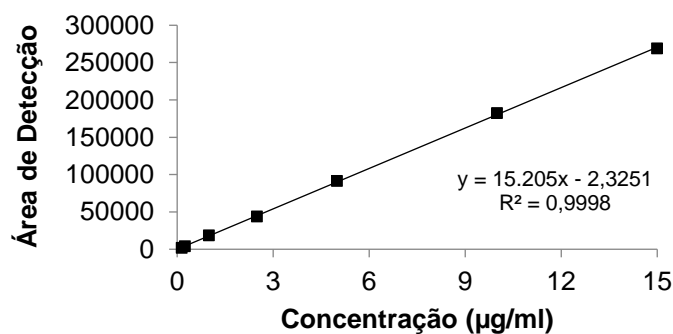


Figura 6. Representação gráfica da média das curvas padrão da dihidrocapsaicina no ensaio de linearidade.

Por último, verificou-se a repetibilidade no doseamento dos fármacos em um único dia em 6 determinações a 100% da concentração teste, a precisão intermediária em três dias nesta mesma concentração e a exatidão, que foi avaliada a recuperação dos capsaicinóides em 3 concentrações que contemplam a concentração baixa média e alta da curva. Os resultados foram avaliados segundo o desvio padrão relativo (DPR) para a repetibilidade e precisão intermediária e a taxa de recuperação para a exatidão.

A repetibilidade do método para a CAPS mostrou um DPR de 2,40% e precisão intermediária de 2,88%. Para a D-CAPS, a repetibilidade mostrou um DPR de 1,90% e precisão intermediária de 2,37%. Quanto a exatidão, os valores de recuperação do ativo em todos os casos encontram-se dentro dos limites especificados pela *International Conference on Harmonization (ICH – 2005)* que estabelece que a taxa de recuperação do ativo deve encontrar-se entre 98% e 102%.

Desta forma, os resultados obtidos para os testes de exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e coeficientes de correlação obtidos nas curvas de calibração permitem considerar o método validado parcialmente para o doseamento simultâneo dos fármacos por CLAE, na faixa de concentração de 0,3 a 30,0 µg/mL para a CAPS e 0,150 a 15,0 µg/mL para a D-CAPS, quando os fármacos encontram-se nanoencapsulados.

8.1.2 Especificidade e quantificação dos capsaicinóides nos hidrogéis de quitosana

A especificidade do método para a quantificação dos fármacos nos hidrogéis de quitosana também foi realizada e mostrou-se específica, uma vez que a análise do hidrogel sem fármaco não provocou o aparecimento de picos que possam interferir no pico dos capsaicinóides, como pode ser visto nas Figuras 32 e 33. O que também ocorreu no processo de quantificação dos capsaicinóides nas suspensões de nanocápsulas. Todos os resultados corroboram com os estudos de Contri e colaboradores (2010).

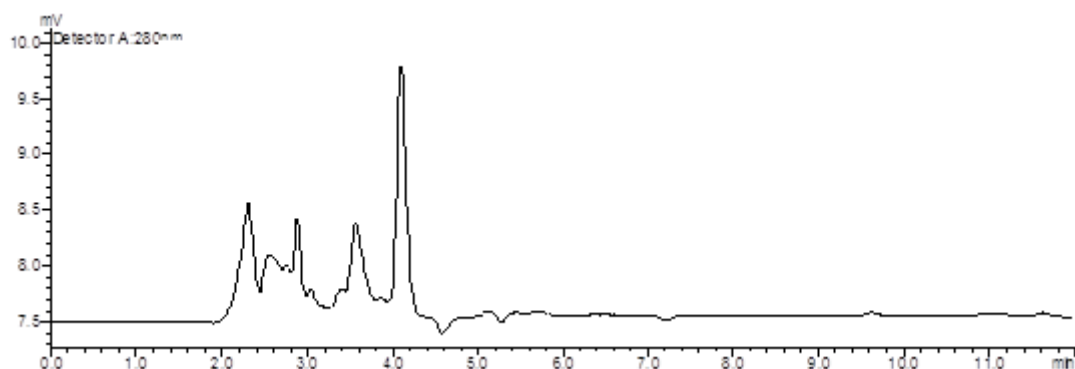


Figura 7. Cromatograma da diluição e dissolução dos HQNC_B. Pode-se verificar que não há presença de pico, o que confirma a especificidade de pico para a capsaicina e dihidrocapsaicina na figura posterior.

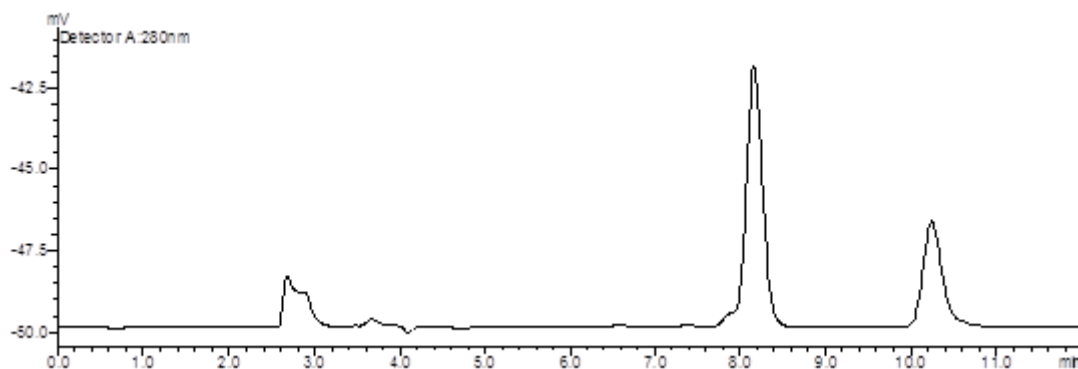


Figura 8. Cromatograma referente às amostras de hidrogel composto por suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo capsaicinóides (HQNC_{Caps}).

8.1.2 Especificidade e quantificação dos nas amostras de pele dos animais

A especificidade do método para a quantificação dos fármacos na pele dos animais também foi realizada e mostrou-se específica, uma vez que a análise da pele dos animais sem fármaco não provocou o aparecimento de picos que possam interferir no pico dos capsaicinóides, como pode ser visto nas Figuras 34 e 35. O que também ocorreu no processo de quantificação dos capsaicinóides nas suspensões de nanocápsulas e hidrogel de quitosana.

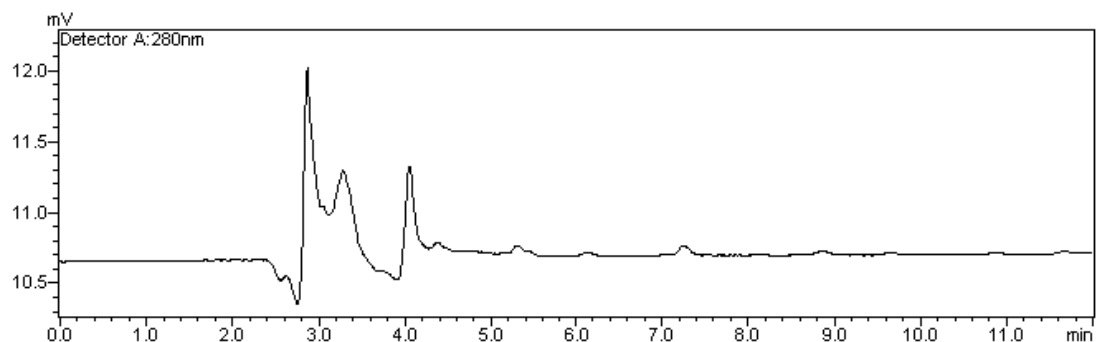


Figura 9. Cromatograma de amostras de pele sem fármaco. Pode-se verificar que não há presença de pico, o que confirma a especificidade de pico para a capsaicina e dihidrocapsaicina na figura posterior.

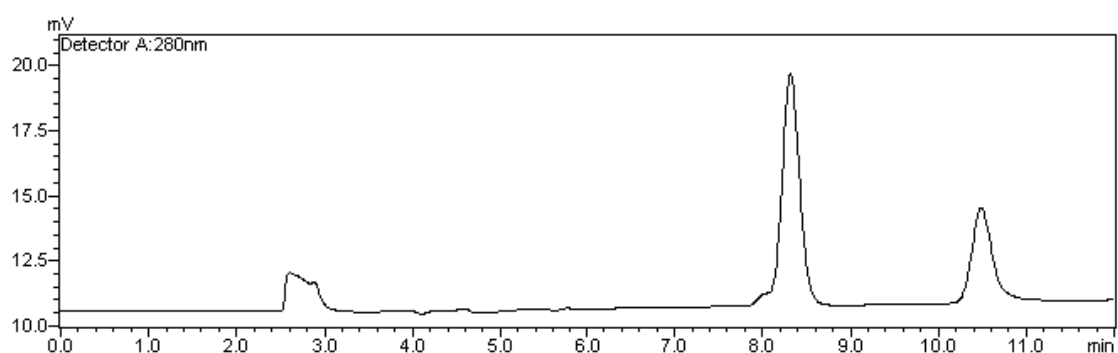


Figura 10. Cromatograma referente às amostras de pele contendo capsaicinóides.

A validação da extração dos capsaicinóides da pele dos animais foi realizada aplicando capsaicinóides dissolvidos em acetonitrila, HQNC_{Caps}, HQET_{Caps} e Creme Comercial em concentração conhecida sobre 1,8 cm² de pele de ratos *Wistar* previamente dissecada e sem fármaco. Assim que as formulações secaram, foi realizada a extração dos fármacos da pele dos animais. Neste protocolo as peles eram picotadas e colocadas em tubos de vidro contendo 5mL de acetonitrila. Este sistema era agitado em vórtex durante 5 minutos e ultrassom durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras eram filtradas com membranda de filtração de 0,45 µm e quantificado em CLAE-UV. Foi obtido uma recuperação próxima de 100% para CAPS e D-CAPS nas amostras de pele que receberam concentrações conhecidas de fármaco. O método foi considerado eficaz para a quantificação dos capsaicinóides na pele dos animais.