

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE
NANOCÁPSULAS DE TRICLOSAN E α -BISABOLOL PARA PREVENÇÃO DE
INFECÇÃO EM FERIDAS DE QUEIMADURAS E SUA INCORPORAÇÃO EM
CURATIVO BIOLÓGICO DE HEMI-CELULOSE (VELODERM[®])

Mestrando: João Guilherme Barreto De Marchi

Porto Alegre, 2015.

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

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE
NANOCÁPSULAS DE TRICLOSAN E α -BISABOLOL PARA PREVENÇÃO DE
INFECÇÃO EM FERIDAS DE QUEIMADURAS E SUA INCORPORAÇÃO EM
CURATIVO BIOLÓGICO DE HEMI-CELULOSE (VELODERM[®])

Dissertação apresentada por **João Guilherme Barreto De Marchi**
Para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 27 de março de 2015, frente à Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero
Universidade Estadual de Campinas

De Marchi, João Guilherme Barreto
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE
NANOCÁPSULAS DE TRICLOSAN E ALFA-BISABOLOL PARA
PREVENÇÃO DE INFECÇÃO EM FERIDAS DE QUEIMADURAS E
SUA INCORPORAÇÃO EM CURATIVO BIOLÓGICO DE HEMI-
CELULOSE (VELODERM®) / João Guilherme Barreto De
Marchi. -- 2015.
97 f.

Orientadora: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nanotecnologia. 2. Efeito Antimicrobiano. 3.
Triclosan. 4. Alfa-bisabolol. 5. Quitosana. I.
Guterres, Sílvia Stanisçuaski, orient. II. Título.

Agradecimentos a CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios 405 (FacFar- UFRGS) e Laboratório de Microbiologia(FacFar-UFRGS), os quais disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Sílvia, por ter prontamente me aceitado e depositado sua confiança em mim, me dando a oportunidade de desenvolver este trabalho ao seu lado durante os anos do mestrado. Pela atenção, ensinamentos e orientação durante todo este período. Obrigado.

À Denise, pelos ensinamentos, ajuda em inúmeros experimentos e contribuições intelectuais, sem as quais esse projeto seria muito mais difícil.

A professora Ana Lúcia Peixoto Freitas (Ucha), pelas contribuições com os dados dos ensaios microbiológicos.

Aos amigos do laboratório 405 e k204 que tornaram o dia-a-dia sempre agradável, seja pelas conversas, discussões científicas ou ajuda na realização de experimentos.

A Fernanda Klein, pelas dicas e ajudas com os experimentos de microbiologia.

À Faculdade de Farmácia e ao PPGCF, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À UFRGS pela oportunidade de realizar meus estudos de mestrado.

Aos meus pais, Osvaldo e Maria Betânia, pelo apoio financeiro, emocional e pela paciência e carinho. Por sempre estar ao meu lado, me incentivar e acreditar no meu potencial.

Aos meus tios Sílvio e Nadir, por terem me acolhido e me dado suporte durante o meu processo de mudança para Porto Alegre.

À Fernanda Garagorry, por ter ficado ao meu lado nas horas difíceis, ter me dado carinho e compreensão, mesmo nos diversos momentos em que não pude estar ao seu lado.

Aos meus familiares, todos eles, pelo carinho, apoio e amizade.

RESUMO

A pele humana é o maior e um dos mais importantes órgãos, esta é a principal barreira entre o corpo e o meio externo, sempre que há um desequilíbrio no mecanismo de defesa inata, o risco de uma infecção é proeminente. A queimadura é um quadro clínico em que a barreira epitelial é danificada, resultado em uma defesa imunológica deficitária e uma grande abundância de nutrientes, o que favorece a proliferação de micro-organismos. No presente estudo foi desenvolvido e caracterizado uma suspensão inovadora de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) com triclosan e α -bisabol, revestida com quitosana (NC_{CQ}) para aplicação tópica em feridas de queimadura, com intuito de reduzir a contaminação microbiana. Foram realizados ensaios de caracterização físico-química, microbiológica e cutânea. Os resultados obtidos para os ensaios de caracterização mostraram que a suspensão de nanocápsulas apresentou diâmetro de partícula adequado, ausência de cristais ou contaminação micrométrica, potencial zeta catiônico, pH levemente ácido, com uma alta eficiência de encapsulação e estável no período de trinta dias. Os ensaios microbiológicos foram realizados frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, através de microdiluição seriada e teste do desafio. O primeiro ensaio mostrou uma redução no valor da concentração inibitória mínima e melhores resultados para quase todas as cepas analisadas frente aos controles e dados da literatura, inclusive *P. aeruginosa*, a qual possui uma alta resistência ao triclosan. O teste do desafio serviu para comprovar que o efeito antimicrobiano da suspensão, se manteve ao longo de 28 dias, mesmo quando incorporada ao curativo de hemi-celulose. Os ensaios cutâneos de permeação/penetração e lavabilidade mostraram que a suspensão de nanocápsulas NC_{CQ} teve uma retenção no estrato córneo, o que é desejável para uma formulação tópica.

Palavras-chave: nanocápsulas poliméricas, antimicrobiano, triclosan e α -bisabolol.

ABSTRACT

The human skin is the largest and one of the most important organs, this is the main barrier between the body and the external environment, whenever there is an imbalance in innate defense mechanism, the risk of infection is prominent. Burn is a clinical condition in which the epithelial barrier is damaged, resulting in a deficient immune defense, also the abundance of nutrients favors to proliferation of microorganisms. In the present study it was developed and characterized a novel suspension of polymeric nanocapsules of poly (ϵ -caprolactone) with triclosan and α -bisabol coated with chitosan (NC_{CQ}) for topical application in burn wounds, in order to reduce microbial contamination. Physical-chemical, microbiological and skin tests were performed in order to prove its applicability. The results obtained for the characterization tests showed that the suspension of nanocapsules had suitable particle diameter, no crystals or micrometric contamination cationic zeta potential, slightly acid pH with a high encapsulation efficiency and stable within thirty days. Microbiological tests were carried forward *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, via serial microdilution and challenge test. The first experiment showed a reduction in the value of the minimum inhibitory concentration and best results for nearly all strains analyzed when compared with controls and data from the literature, including *P. aeruginosa*, which has a high resistance to triclosan. The challenge test was used to demonstrate that the antimicrobial effect of the suspension was maintained over 28 days even when incorporated into the dressing hemi-cellulose. The skin permeation/penetration and washability tests of NC_{CQ} nanocapsule suspension showed that it had retention in the *stratum corneum*, which is desirable for a topical formulation.

Keywords: polymeric nanocapsules, antimicrobial, triclosan and α -bisabolol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Apresentação comercial do Veloderm®. B) Película biológica.....	29
Figura 2: Estrutura química do triclosan.....	30
Figura 3 Estrutura química do α -Bisabolol.	32
Figura 4: Processo de obtenção da suspensão de nanocápsulas. A: Mistura da solução etanólica a solução de acetona. B: Injeção da fase orgânica na fase aquosa. C: Rota-evaporação dos solventes. D: Revestimento com solução de quitosana.....	38
Figura 5: Esquema de preenchimento da placa de microdiluição seriada, onde C+ é o controle positivo de crescimento e C- o controle do meio.	44
Figura 6: Esquema de disposição dos componentes presentes na célula de Franz.	49
Figura 7: Célula de Franz modificada utilizada para o experimento de lavabilidade.	50
Figura 8: Perfil de distribuição granulométrico das nanocápsulas de α -bisabolol, revestidas com quitosana, veiculando triclosan.	52
Figura 9: Cromatograma de uma das leituras do ultra-filtrado, mostrando a ausência do pico referente ao triclosan.....	53
Figura 10: Teor do triclosan no tempo 0 (T=0) e após 30 dias (T=30). Valor referente a massa total de uma suspensão de 10 mL.....	53
Figura 11: Comparação do perfil de liberação do triclosan livre em meio receptor etanol:água (1:1), através da técnica de diálise, (n=3).....	55
Figura 12: Perfis de liberação do triclosan da nanocápsula (NC _{CQ}) e livre (T _{livre}) em meio receptor etanol:água (1:1 v/v), através da técnica de diálise, (n=3). .	55
Figura 13: Modelagem matemática monoexponencial do perfil de liberação do triclosan encapsulado para o meio. Eixo X é igual ao tempo (min) e o eixo Y a porcentagem.	56
Figura 14: MET da suspensão de NC _{SQ} , mostrando superfície regular com margens pigmentadas.....	57
Figura 15: MET da suspensão de NC _{CQ} , mostrando superfície irregular com franjas.	57
Figura 16: Curva de calibração em espectrofotômetro da absorção em diferentes concentrações da suspensão de NC _{CQ} . Resultado em triplicata.	57

Figura 17: Gráfico de distribuição das médias do potencial zeta em mV de <i>P. aeruginosa</i> (linha vermelha), e <i>P. aeruginosa</i> + suspensão de NC _{CQ} (1:1) (linha verde). Gráfico gerado pela técnica de mobilidade eletroforética, mostrando a inversão do potencial zeta após o contato com as nanocápsulas.....	65
Figura 18: Hipóteses para o possível mecanismo de ação da NC _{CQ} . A: Atração das nanocápsulas catiônicas pela carga superficial negativa do micro-organismo. B: Ligação eletrostática entre a nanopartícula e o micro-organismo, as quais impedem a interação com a superfície e conseqüentemente a fixação. C: O grande número de partículas cria uma nuvem eletrônica que repele íons positivos e quela com partículas negativas. D: Possível internalização de nanocápsulas e liberação do conteúdo no interior do micro-organismo. Núcleo= α -bisabolol + triclosan; NC _{CQ} = Nanocápsula revestida; IP= Íons positivos; IN= Íons negativos.	67
Figura 19: Perfis de penetração da suspensão de NC _{CQ} e T α _{livre} nas diferentes camadas da pele. **, Diferença estatisticamente significativa para P<0,01 e ***, Diferença estatisticamente significativa para P<0.001, na comparação entre os grupos livre e nanoencapsulado (Bonferroni).....	68
Figura 20: Perfil de lavagem do triclosan em diferentes formulações ao longo do tempo.	69
Figura 21: Massa percentual total lavada nas diferentes formulações no tempo de 16 minutos. *Diferença estatisticamente significativa para P<0.05 quando todas as formulações (Bonferroni).	70
Figura 22: A) Leitura de ensaio de especificidade, ausência de pico no tempo de retenção do Triclosan (4,2 minutos). B) Mostrando o pico em 4,2 minutos, referente ao triclosan presente em uma suspensão NC _{CQ} , não observado na figura A, mostrando que o método é específico.	86
Figura 23: Média das três curvas analíticas de triclosan em acetonitrila.....	87
Figura 24: Média das três curvas analíticas de triclosan em etanol:água (1:1).87	
Figura 25: Valores de absorvância (λ =625 nm) para todas as formulações testadas contra <i>E. coli</i> . A= T _{livre} ; B= α _{livre} ; C= NC _{SQ} ; D= NC _{CQ} E= NC _{BR} .* Diferença significativa estatisticamente para P<0.05 quando comparado absorvância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença significativa estatisticamente para P<0.001 na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni).	91

Figura 26: Valores de absorção ($\lambda=625$ nm) para todas as formulações testadas contra *S. aureus*. A= T_{livre}; B= α _{livre}; C= NC_{SQ}; D= NC_{CQ}, E= NC_{BR}. * Diferença significativa estatisticamente para P<0.05 quando comparado absorbância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença significativa estatisticamente para P<0.001 na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni). 92

Figura 27: Valores de absorção ($\lambda=625$ nm) para todas as formulações testadas contra *P. aeruginosa*. A= T_{livre}; B= α _{livre}; C= NC_{SQ}; D= NC_{CQ}, E= NC_{BR}. * Diferença significativa estatisticamente para P<0.05 quando comparado absorbância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença estatisticamente significativa para P<0.001 na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni). 93

Figura 28: Valores de absorção ($\lambda=570-690$ nm) para todas as formulações testadas contra *C. albicans*. A= T_{livre}; B= α _{livre}; C= NCSQ; D= NCCQ. Os valores de CIM foram as últimas concentrações maiores que 80% de dano celular em relação ao controle positivo. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas analisadas e meios de cultura utilizados para cada micro-organismo.....	47
Tabela 2: Resultados das análises de diâmetro e polidispersão.....	52
Tabela 3: Valores velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (min) e tipo de distribuição.	55
Tabela 4: CIM do triclosan livre (T_{livre}), α -bisabolol livre (α_{livre}), suspensão de nanocápsulas sem revestimento (NC_{SQ}), suspensão de nanocápsulas com revestimento (NC_{CQ}), suspensão de nanocápsulas brancas (NC_{BR}), triclosan em DMSO (T_{DMSO}) e nanopartículas de quitosana (NPQ) para as diferentes espécies de micro-organismos avaliadas. *Valor referente ao CIM_{25} . ** Valor referente à concentração que o triclosan estaria, caso fizesse parte da formulação. *** Valor da concentração de quitosana na formulação.....	62
Tabela 5: Comparação do efeito antimicrobiano da suspensão de nanocápsulas revestidas (NC_{CQ}) com as diferentes formulações analisadas, frente às espécies microbianas testas. * Para o α_{livre} foi comparada a concentração do α -bisabolol presente na NC_{CQ} . [†] Valor teórico da concentração de triclosan, caso fizesse parte da formulação.	63
Tabela 6: Número de partículas por unidade formadora de colônia (UFC) em cada poço de diluição. NP= Número de partículas, [] = Concentração percentual da suspensão inicial e R = Razão entre o número de partículas e UFC.....	64
Tabela 11: Desvio Padrão Relativo intra-dia e inter-dia das análises de precisão intermediária da recuperação.....	90

SUMÁRIO

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 QUEIMADURA.....	27
3.2 CURATIVO BIOLÓGICO DE HEMICELULOSE (VELODERM®).....	28
3.3 TRICLOSAN.....	29
3.4 α -BISABOLOL.....	31
3.5 QUITOSANA	32
3.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAS.....	35
4.1.1 Matérias-primas:	35
4.1.2 Aparelhos e equipamentos:	36
4.1.3 Material de consumo:.....	36
4.2 METODOLOGIA.....	36
4.2.1 Preparação de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana veiculando α -bisabolol e triclosan:	36
4.2.2 Preparação dos controles: triclosan livre (T_{livre}), α -bisabolol livre (α_{livre}), emulsão de α -bisabolol e triclosan ($T\alpha_{livre}$) e nanocápsulas brancas (NC_{BR})	38
4.2.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas:.....	38
4.2.4 Atividade antimicrobiana das nanocápsulas.....	42
4.2.5 Análises Cutâneas.....	48
4.2.6 Incorporação das nanocápsulas ao Veloderm®	50
4.2.7 Análise Estatística.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1	Preparação e caracterização físico-químicas	51
5.1.1	Suspensões de nanocápsulas	51
5.1.2	Triclosan e α -bisabolol livres.....	58
5.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
5.2.1	Concentração inibitória mínima (CIM)	58
5.2.2	Determinação do número de nanocápsulas por unidade formadora de colônia (UFC)	63
5.2.3	Determinação do potencial zeta de bactérias.....	64
5.2.4	Teste do desafio (<i>Challenge Test</i>)	65
5.3	ANÁLISES CUTÂNEAS	67
5.3.1	Permeação e Penetração	67
5.3.2	Lavabilidade.....	69
6	CONCLUSÕES.....	73
7	PERSPECTIVAS	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9	ANEXOS.....	85
9.1	ANEXO 1.....	85
9.1.1	Validação do método analítico para doseamento de triclosan por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE:.....	85
9.2	ANEXO 2:.....	90
9.2.1	Validação do método de extração do triclosan em curativo de hemi-celulose e pele abdominal de porcas fêmeas:	90
9.3	ANEXO 3.....	91
9.3.1	Valores de absorvância por turbidimetria.....	91
9.4	ANEXO 4.....	95
9.4.1	Laudo de análise do teste desafio (<i>Challenge Test</i>).....	95

1. INTRODUÇÃO

As queimaduras são lesões causadas por vários fatores como calor, radiação, atrito, substâncias químicas e eletricidade. A sociedade brasileira de queimaduras (SBQ) as classifica em três diferentes níveis, a de primeiro grau, quando afeta só a epiderme, não havendo bolhas, provocando vermelhidão, dor e havendo descamação após 4-6 dias. Já a queimadura de segundo grau atinge a epiderme e a derme, formando bolhas vermelhas ou brancas e havendo a regeneração dentro 7-21 dias, e terceiro grau, quando há a formação de placas esbranquiçadas ou enegrecidas, com textura coriácea e sem reepitelização.

A pele é a principal barreira entre o corpo e o meio externo, sempre que há um desequilíbrio no mecanismo de defesa inata, o risco de uma infecção é proeminente. Mesmo com o desenvolvimento de agentes antimicrobianos de aplicação tópica e sistêmica, avanços no suporte nutricional e na utilização de técnicas cirúrgicas de excisão de tecidos danificados e aplicação de enxertos em áreas afetadas, a infecção microbiana e consequente sepse (infecção generalizada) continua sendo um dos maiores desafios e umas das principais causas de óbito para queimados (Nguyen *et al.*, 1996; Altoparlak *et al.*, 2004).

A sepse ocorre quando há um desequilíbrio entre o balanço hospedeiro e micro-organismos. Para que haja uma infecção a defesa do hospedeiro deve estar reduzida, o que ocorre quando há a destruição da barreira física da pele, favorecendo a invasão de micro-organismos pela via linfática ou sanguínea. A sepse pode ser causada por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos (Macedo *et al.*, 2005). A maior parte da área afetada por uma queimadura é livre de contaminantes microbiológicos, entretanto, micro-organismos da flora dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas, podem sobreviver ao calor, migrar para a superfície e colonizar rapidamente o tecido danificado (Luterman *et al.*, 1986)

Para que haja uma correta cicatrização de uma ferida por queimadura se faz necessária a utilização de um antimicrobiano para combater, de forma profilática, possíveis patógenos oportunistas. A forma mais frequente de tratamento de ferida de queimadura é através de higienização do local, seguido

de fechamento com curativo. Os mais comumente encontrados em todo mundo são os curativos semi-oclusivos (Bolgiani, *et al.*, 2009), muitas vezes por serem os financeiramente mais acessíveis (Liu *et al.*, 2013). Entretanto, estes apresentam grandes desvantagens, como necessidade higienização e trocas constantes do curativo.

Neste contexto foi desenvolvido o Veloderm[®], uma película biológica de aplicação única que apresenta resultados melhores que os principais concorrentes do mercado (Melandri *et al.*, 2006; Kothamasu *et al.* 2012), sendo comercializado desde 2004 no Brasil, inserido na categoria dos dispositivos médicos (correlatos). Apesar de apresentar diversas vantagens como alívio da dor, melhora da cicatrização, permitir o acompanhamento da ferida e não necessitar de trocas, este curativo não possui agentes antimicrobianos, o que é um inconveniente em casos de contaminação microbiana, levando a uma interrupção do tratamento (Ricci *et al.*, 2010). Sendo assim, a incorporação de um sistema antimicrobiano poderia promover a uma melhor adesão dos pacientes ao tratamento, além de reduzir o número de interrupções do mesmo.

A ferida de queimadura apresenta um quadro complexo com possíveis infecções por bactérias gram-negativas, gram-positivas e/ou fungos e infecções tardias, por micro-organismos que migram dos apêndices da pele para a superfície da ferida (Altoparlak *et al.*, 2004). Por estas razões é desejável o emprego de uma formulação com capacidade antimicrobiana com amplo espectro de ação, que tenha um tempo de permanência adequada no local de atuação, que seja capaz de apresentar uma liberação controlada das substâncias veiculadas, que contenha uma dose reduzida de fármaco, que possa ser incorporada ao curativo e, de preferência, que apresente em paralelo uma ação cicatrizante.

Em tese, todas essas características poderiam ser supridas pela utilização da nanocápsulas poliméricas, as quais permitem reduzir a dose do fármaco utilizado e ter uma maior ação no alvo específico. As nanocápsulas poliméricas são capazes de produzir a liberação do fármaco no alvo por dias e até semanas (Suphya *et al.*, 2012; Schaffazick *et al.*, 2003). Adicionalmente, as nanocápsulas podem prover uma interação efetiva entre o curativo e o antimicrobiano, uma vez que estas estruturas também apresentam propriedades bioadesivas.

Um dos antimicrobianos tópicos muito utilizados em feridas e queimaduras e que poderia ser utilizado em associação com o Veloderm[®], é o triclosan, vendido sob o nome comercial de Irgasan[®]. Este apresenta características interessantes para a nanoencapsulação, como alta lipofilicidade, estabilidade química e amplo espectro de ação, contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e contra fungos (SCCS, 2010). O triclosan apresenta um $\text{LogD} = 5,17$ em $\text{pH} = 7$. De acordo com o modelo de distribuição de substâncias nas nanocápsulas de núcleo lipídico proposto por Oliveira e colaboradores (2013) este valor de LogD levaria a uma distribuição do triclosan nas nanocápsulas do tipo VI, ou seja, retido no núcleo oleoso e no interior da parede polimérica.

Para compor o núcleo oleoso das nanocápsulas o α -bisabolol parece reunir as características ideais já que é um potencializador da ação antibiótica de fármacos lipofílicos (Brehm-Stecher & Johnson, 2003), possui atividade cicatrizante, anti-irritante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticolinesterase e anti-oxidante (Darra *et al.* 2008; Kamatou & Viljoen, 2010). Todos esses efeitos são desejáveis para aplicações tópicas com efeito local, como é o caso de um curativo, além do fato deste possuir um LogD similar ao triclosan; com isso seria também uma substância efetivamente contida no núcleo oleoso das nanocápsulas, com potencial para liberação lenta pelo processo de difusão para o meio externo. Outra estratégia promissora para a aplicação em feridas é o revestimento das nanocápsulas com quitosana, pois este biopolímero catiônico apresenta efeito antimicrobiano o que poderia contribuir para manter a área livre de contaminação durante o processo de cicatrização.

Tendo em vista o exposto, este estudo se propõe a desenvolver e caracterizar uma suspensão de nanocápsulas poliméricas inovadora obtida mediante a associação inédita de poli(ϵ -caprolactona) como polímero formador das nanocápsulas, com núcleo oleoso de α -bisabolol revestidas com quitosana veiculando triclosan. Adicionalmente, também é objetivo do trabalho verificar a possibilidade de sua incorporação em película biológica de hemi-celulose (Veloderm[®]) e avaliar *in vitro* seu potencial uso terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com núcleo oleoso de α -bisabolol revestida com quitosana contendo triclosan, bem como estudar a sua impregnação em curativo biológico de hemi-celulose, com vistas ao tratamento de feridas causadas por queimaduras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo de α -bisabolol e triclosan revestidas com quitosana em termos de:
 - Eficiência de encapsulação
 - Potencial Zeta
 - Tamanho de partícula
 - Índice de polidispersão
 - pH
 - Eficiência de encapsulação
 - Teor
 - Morfologia
 - Densidade de partículas
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente diferentes cepas padrão de bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) e levedura (*Candida albicans*).
- Verificar a eficácia antimicrobiana da suspensão de nanocápsulas de α -bisabolol e triclosan contra cepas de bactérias e levedura, assim como o do sistema (nanocápsulas + película de hemicelulose).

- Verificar o perfil de permeação e penetração do fármaco nanoencapsulado em pele abdominal de porcas fêmeas por célula de Franz automatizada.
- Determinar a capacidade de adesão das nanocápsulas à pele abdominal de porcas lesada, em ensaio de lavabilidade.
- Estudar a incorporação das nanocápsulas produzidas à película biológica de hemicelulose e caracterizar o sistema através do doseamento do teor de triclosan incorporado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUEIMADURA

A associação americana da queimaduras estima que neste exato momento, só nos Estados Unidos, existam cerca de 450.000 pessoas hospitalizadas por causa de queimaduras, havendo uma taxa de sobrevivência de 96,6% para esse tipo de acometimento (American Burn Association, 2015). No ano de 2013, 3.400 pessoas vieram a falecer devido a queimaduras, incêndios ou inalação de fumaça (American Burn Association, 2015). No Brasil não existem dados oficiais que apontem o número exato de queimados, mas dados de 2002 apontam para um gasto mensal do Ministério da Saúde de R\$ 1 milhão, só com internação e de tratamento de pessoas com queimaduras graves, conforme o Informe Saúde (2002).

Estima-se que 75% das mortes oriundas de queimaduras extensas estejam relacionadas a infecções nas áreas afetadas. Esse tipo de ferimento destrói as barreiras terminais da pele, que normalmente evitam a passagem de micro-organismos, tornando a queimadura a origem mais frequente da sepse em pacientes acometidos por essas lesões (Altöparlak *et al.*, 2004). A presença de proteínas desnaturadas no local da queimadura, somada à baixa vascularização dos locais acometidos, tornam difícil o acesso para células de defesa, anticorpos e medicamentos de ação sistêmica, favorecendo a proliferação de micro-organismos (Pruitt & McManus, 1984).

A falha no mecanismo de proteção da pele, associada à baixa imunidade tornam o paciente que sofreu queimadura, muito suscetível a infecções bacterianas e fúngicas, uma das complicações mais sérias (Gupta *et al.*, 2015). Pruitt Jr (1984) elencou os fatores de risco para infecção de uma ferida de queimadura, separando-os em dois grupos, os fatores relacionados ao paciente (extensão e profundidade da ferida, idade do paciente, doença pré-existente, grau de umidade e temperatura da ferida, prejuízo do fluxo sanguíneo e acidoses) e os fatores relacionados ao micro-organismo (densidade por grama

de tecido, motilidade, resistência a antimicrobianos, endotoxinas, exotoxinas, fatores de permeabilidade e outros fatores).

É importante evitar a contaminação bacteriana de um tecido danificado por uma queimadura para prevenir a ocorrência de uma contaminação secundária e promover uma adequada cicatrização da área afetada. Comumente, utilizam-se curativos oclusivos (p.ex. gaze) para evitar contaminação microbiana por agentes externos. Entre outras opções estão os hidrogéis, hidrocolóides, filmes, alginatos, produtos biológicos e espumas (Cho Lee *et al.*, 2005). O curativo ideal deve auxiliar a manter a ferida com o nível de umidade apropriado e de temperatura constante, acelerar o processo de cicatrização, ativar o desbridamento autolítico da ferida, proteger as células recém-formadas, facilitar a angiogênese e reepitelização, aliviar a dor e proteger a ferida de contaminação bacteriana (Maneerung *et al.*, 2008).

3.2 CURATIVO BIOLÓGICO DE HEMICELULOSE (VELODERM®)

O Veloderm® é um curativo que vem recebendo uma atenção crescente na terapêutica de queimaduras (Fig. 1A). É composto por uma película biológica de origem vegetal metabolizada por alguns micro-organismos (*Acetobacter xylinum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) quando cultivados em extrato de cana-de-açúcar, dando origem a uma estrutura polimérica de hemicelulose microcristalina (Fig. 1B). Esta age como um substituto temporário da pele, formando uma camada protetora sobre feridas em casos de queimaduras, dermoabrasões, úlceras e áreas de autoenxertos (Jian Liu *et al.*, 2013, Melandri *et al.*, 2006, Ferreira *et al.* 2010).

Suas características tais como espessura, flexibilidade, transparência e densidade são similares à pele humana tendo como particularidade a permeabilidade a gases, vapores e algumas macromoléculas, e impermeabilidade a água e bactérias (Libero *et al.*, 2008 & Ricci *et al.*, 2010). O Veloderm® também possui propriedade de boa aderência ao leito da ferida, protegendo-a da contaminação externa, aliviando a dor, promovendo a

migração dos fibroblastos e gerando um meio adequado para o desenvolvimento dos mesmos, e a reepitelização (Ricci *et al.*, 2010 & Ferreira *et al.* 2010). Essas propriedades são devidas ao alto grau de cristalinidade (>75%) e o baixo grau de polimerização que as fibras apresentam (de 200 a 1000 monômeros) (Ricci *et al.*, 2010).

Apesar de ser um produto interessante o Veloderm® não possui agentes antimicrobianos, o que é um inconveniente em casos de contaminação microbiana, levando a uma interrupção do tratamento (Ricci *et al.*, 2010). Para uma maior segurança e adesão ao tratamento a incorporação de um antimicrobiano de amplo espectro se faz necessária.

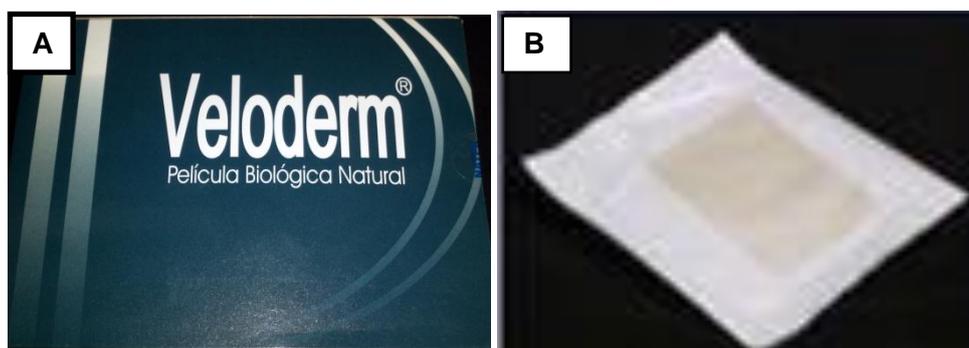


Figura 1: A) Apresentação comercial do Veloderm®. B) Película biológica

3.3 TRICLOSAN

O triclosan (Fig. 2) é um antibiótico sintético não iônico que apresenta um amplo espectro de ação contra diversos microorganismos, dentre eles várias bactérias gram-negativas e positivas, alguns fungos e protozoários (SCCS, 2010). Seu uso tem sido estudado por mais de 30 anos, se tornando o bisfenol mais potente e mais utilizado. Apresenta uma ação bacteriostática em baixa concentrações e bactericida em altas concentrações.

A toxicidade aguda, crônica, teratologia e mutagenicidade do triclosan foi estudada em animais e humanos, sendo recentemente revisada (Jones *et al.*,

2000; SCCS, 2010). Em estudo com pacientes portadores de HIV, enxaguantes bucais contendo triclosan mostraram ser capazes de reduzir a contagem de *Candida* na saliva, sem apresentar efeitos tóxicos ou resistência (Patel *et al.*, 2008).

O triclosan não apresentou toxicidade aos tecidos da cavidade bucal, efeitos carcinogênicos ou mutagênicos. Demonstrou segurança em preparações orais testadas em camundongos, ratos e cães, com uma dose letal superior a 3500 mg/kg para 50% dos animais. Em administração intravenosa a dose letal foi de 19 a 29 mg/kg para camundongos e ratos (Bhargava & Leonard, 1996).

Apesar de alguns estudos ainda alegarem que o triclosan possui mecanismo de ação com múltiplos alvos, acredita-se que a sua ação está mais relacionada com a inibição da enzima de biossíntese do ácido graxo, redutase da proteína carreadora enoil-acila, em bactérias gram-negativa e gram-positiva, assim como em micobactéria. Essa inibição promove a formação de poros afetando a estrutura e função da membrana (McMurry *et al.*, 1998; Schweizer, 2001).

Já foram reportadas bactérias resistentes ao triclosan como *P. aeruginosa*, as quais apresentam essa característica devido a bombas de efluxo (Mima *et al.*, 2007; Kumar & Schweizer, 2005), resistindo ao antimicrobiano mesmo em doses superiores a 1 mg/mL (Bhargava & Leonard, 1996). No entanto, não se sabe se esse mecanismo teria efeito sobre o triclosan nanoencapsulado.

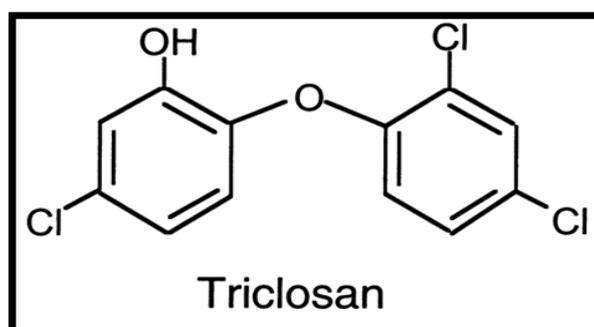


Figura 2: Estrutura química do triclosan.

3.4 α -BISABOLOL

O α -bisabolol é um álcool sesquiterpênico monocíclico natural (Fig. 3), assim como o triclosan, possui um elevado caráter lipofílico, com um $\text{LogD} = 5,07$ em $\text{pH} = 7$. Foi inicialmente isolado da planta *Matricaria chamomilla*, pertencente à família Asteraceae. Sua forma mais encontrada na natureza e mais ativa é o α -(-)bisabolol, também conhecido como levomentol (Darra *et al.* 2008).

Devido suas propriedades α -bisabolol tem sido aplicado em cosméticos como pós-barba, loção corporal, desodorante, batom, protetor solar, produtos para bebês e etc. A camomila, que possui um elevado percentual de α -bisabolol, teve sua atividade cicatrizante e anti-inflamatória testada, *in vitro* e *in vivo*, apresentando resultados melhores que os com corticoides, como triancinolona e clobetasol, tradicionalmente utilizados na clínica (Martins *et al.*, 2009). Outros trabalhos também observaram essa capacidade cicatrizante (Villegas *et al.*, 2001). Além disso, a segurança do uso de óleo essencial da camomila (FDA, 2011 *apud* Kamatou & Viljoen, 2010) tem sido confirmada.

Em outro estudo comprovou-se a propriedade do α -bisabolol em bloquear nervos periféricos, tendo ação similar à da lidocaína, reduzindo a excitabilidade e aumentando o limiar da dor, mas sem ser por uma via uso-dependente (Alves *et al.*, 2010). Essa propriedade é particularmente interessante para o tratamento de feridas como as queimaduras.

O α -bisabolol teve testada sua capacidade de aumentar a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a antibióticos, do tipo hidrofílico (gentamicina) e lipofílico (eritromicina). Foi verificado que estes tiveram sua atividade aumentada, principalmente nas bactérias gram-negativas. Segundo os autores isso poderia ser justificado pela capacidade de os sesquiterpenoides agirem deturpando a função normal de barreira da membrana celular bacterianas, permitindo a entrada de compostos exógenos, como antibióticos (Brehm-Stecher & Johnson, 2003).

Apesar de os sesquiterpenos apresentarem a propriedade de promover a permeação transepitelial, o α -bisabolol apresenta essa propriedade reduzida, uma vez que possui uma cadeia de hidrocarbonetos menor, quando

comparado a outros sesquiterpenos, reduzindo a passagem de substâncias (Brehm-Stecher & Johnson, 2003).

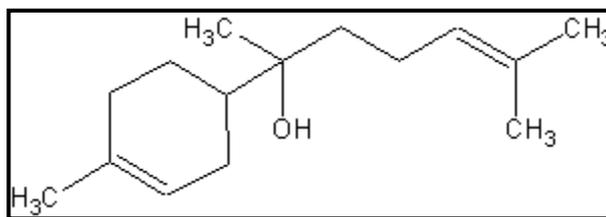


Figura 3 Estrutura química do α -Bisabolol.

3.5 QUITOSANA

Um dos polímeros naturais que é muito utilizado para obtenção de nanocápsulas poliméricas e nanopartículas ou revestimento da superfície das mesmas é a quitosana. Isso se deve a sua biocompatibilidade, atoxicidade, biodegradabilidade, e propriedades antibacterianas (Pillai *et al.*, 2009; Rinaudo, 2006). Estudos anteriores demonstraram que a quitosana apresenta um amplo espectro de ação antimicrobiano contra bactérias gram positivas e negativas (Chung *et al.*, 2004), fungos e leveduras (Rabea *et al.*, 2003), vários mecanismos de ação para tal atividade têm sido propostos, entre eles, a ligação a cargas negativas na parede microbiana, levando ao aparecimento de poros e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático (Qi *et al.* 2004), ligação com traços de metais provocando inatividade enzimática (Cureo *et al.* 1991), entre outras.

A quitosana também promove a cicatrização de feridas por acelerar a infiltração de células inflamatórias e estimular a migração e replicação de fibroblastos, além de aumentar a produção de colágeno tipo III na área da ferida (Ueno *et al.*, 1999). Essas características fazem da quitosana uma boa candidata para aplicações em feridas, não sendo apenas uma barreira entre o meio interno (núcleo) e o meio externo (fase aquosa), mas sim um componente

de ação farmacológica, aumentando o espectro de ação antimicrobiana e acelerando a cicatrização da ferida.

3.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam atividade diferenciada devido a sua escala reduzida. Estas têm sido estudadas para veiculação de vários agentes antimicrobianos e têm obtido bons resultados em aumentar a eficácia terapêutica no combate de várias doenças infecciosas (Huh & Kwon, 2011). As nanopartículas poliméricas são ótimos veículos para a administração de fármacos antimicrobianos tópicos. Contrariamente ao fármaco livre em solução, elas não se dissolvem pelas camadas da pele, aumentando a concentração no sítio de ação e não atingindo a circulação sistêmica, ficando retidas nas camadas mais superficiais, tanto na pele íntegra (Alvarez-Román *et al.* 2004) como na inflamada (Abdel-Mottaleb *et al.* 2012).

Em um estudo com nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) veiculando clorexidina, estas foram capazes de provocar a inibição sustentada de várias bactérias *in vitro* e atividade bactericida sustentada contra *Staphylococcus epidermidis*. Este efeito foi provocado por interações das nanocápsulas com componentes das bactérias, facilitando a difusão contínua do fármaco do núcleo, para a membrana celular da bactéria e limitando a adesão das mesmas a superfície (Lboutounne *et al.* 2002).

Nanopartículas de quitosana mostraram poder de inibir o crescimento de diversos micro-organismos e um grande potencial bactericida, sendo mais ativo que a quitosana solúvel e doxiciclina (Qi *et al.*, 2004). Microscopia de força atômica das mesmas nanopartículas de quitosana em contato com *S. choleraesuis* demonstrou a sua capacidade de provocar a ruptura da membrana celular bacteriana promovendo o extravasamento do citoplasma e levando a morte celular (Qi *et al.*, 2004).

Para a produção de nanocápsulas revestidas com quitosana, o pH deve ser ajustado para 5, segundo o método descrito por Mazzarino e colaboradores (2012), o que faz com que o triclosan apresente um LogD de 5,17. Segundo (Oliveira *et al.*, 2013) com esse valor o fármaco encontra-se com uma distribuição do tipo VI, ou seja, localizando-se principalmente na parede polimérica e no núcleo. Com isso o fármaco retido no núcleo seria liberado mais rapidamente em contato com o exudato e consequente difusão, enquanto que o retido no interior da parede polimérica seria liberado lentamente pelo processo de erosão. Somado a isso, o efeito antimicrobiano da quitosana manteria a área livre de contaminação durante o processo de cicatrização.

Várias nanopartículas foram anteriormente relatadas na literatura como possuindo a capacidade de reverter à resistência de micro-organismos a antimicrobianos. Nanopartículas de quitosana, marcadas com ácido fólico e veiculando vancomicina foram utilizadas como *cavalos de troia*, para reverter a resistência de isolados clínicos de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) (Chakraborty *et al.* 2010). Em outro estudo foi relatada a capacidade de nanopartículas poliméricas de poliacrilato, quando ligadas covalentemente à penicilina, de restaurar a atividade de antibióticos beta-lactâmicos frente a *S. aureus* resistente à metacilina (Turos *et al.*, 2007; Abeylath & Turos, 2008). Apesar dos resultados positivos destes estudos, cabe a ressalva sobre a bioincompatibilidade dos acrilatos e o fato de a ligação da penicilina ao polímero estar formando uma nova substância.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAS

4.1.1 Matérias-primas:

- Triclosan (Fagron, São Paulo, Brasil);
- Veloderm[®] (Natek, João Pessoa, Brasil);
- Poli(ϵ -caprolactona) MM = 80.000 Da (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Quitosana de baixo peso molar MM= 50,000–190,000 g.mol⁻¹, 75–85% desacetilada (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Polissorbato 80 (Henrifarma, São Paulo, Brasil);
- Alfa-bisabolol Natural (Fagron, São Paulo, Brasil);
- Lipoid S75[®] (Fosfolípido de soja sem gordura, com 70% de fosfatidilcolina) (Lipoid AG, Ludwigshafen, Alemanha);
- Caldo Mueller Hinton 2 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- RPMI-MOPS (RPMI 1640 meio contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio – Sigma, St. Louis, EUA – pH 7,0 com 0,165 mol/L de tampão MOPS – Sigma);
- MTT brometo de ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Álcool Isopropílico (Vetec, Duque de Caxias, Brasil);
- Ácido acético glacial (Fmaia, Brasil)
- Acetona padrão-analítico (Vetec, Duque de Caxias, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Tedia, São Paulo, Brasil);
- Etanol grau HPLC (Tedia, São Paulo, Brasil);

4.1.2 Aparelhos e equipamentos:

- Agitador magnético - Fisatom[®] Mod. 752A (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica APX-200, Denver Instrument (NY, EUA);
- Evaporador rotatório (Büchi, Suíça)
- Mastersizer 2000 – Malvern (Worcestershire, Reino Unido);
- Zetasizer[®] – Nano-ZS Modelo ZEN 3600 – Malvern (Inglaterra);
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Shimadzu LC 20A (Tokyo, Japão);
- Coluna cromatográfica Nova-Pax de fase reversa C18 (150 x 3.9 mm, 4 μ m , 110 Å de diâmetro de poro, Waters[®], Milford, Estados Unidos);
- Equipamento automatizado de células de difusão Franz (Hanson Research, EUA);
- Espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian, USA);
- Espectrofotômetro Femto 600 plus (São Paulo, Brasil)

4.1.3 Material de consumo:

- Membranas de acetato de celulose 25 mm (*cut off* 14.000 Da) (Sigma-Aldrich[®])
- Ultrafree-MC[®] 10.000 Da (Millipore, Bedford, USA);
- Placa de cultura estéril, 96 poços, fundo chato (Corning, Nova Iorque, USA);

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Preparação de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana veiculando α -bisabolol e triclosan:

A técnica empregada para a obtenção da suspensão de nanocápsulas foi de precipitação de polímero pré-formado pelo deslocamento de solvente

(nanoprecipitação), descrita por (Fessi *et al.* 1989, Bender *et al.* 2012 & Jornada *et al.* 2015).

Para a preparação das suspensões de nanocápsulas foram preparadas duas fases, uma orgânica e uma aquosa. A orgânica foi dividida em dois béqueres, o primeiro contendo 0,1 g de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e 0,01 g de triclosan adicionados a 25 ml de acetona e aquecidos a 40°C sob agitação, até a total dissolução. No segundo béquer uma alíquota de 160 μ L (a temperatura ambiente) de α -bisabolol e 0,077g de lecitina de soja foram dissolvidos sem aquecimento, sob agitação em 10 ml de etanol absoluto. Ao final da dissolução, o béquer contendo a solução etanólica foi vertido no contendo a solução de acetona para obtenção de uma única fase orgânica. A fase aquosa foi preparada concomitantemente com a FO, em um terceiro béquer, no qual 0,077 g de polissorbato 80 foi dissolvido sob agitação em 20 ml de água ultrapura MilliQ[®].

Após a total dissolução da fase orgânica, esta foi injetada na fase aquosa sob agitação utilizando um funil. Com a formação de um líquido turvo a suspensão foi mantida sob agitação por mais 10 minutos. Esta foi concentrada a 40°C sob pressão reduzida em um rota-evaporador, para a obtenção da suspensão de nanocápsulas não revestidas (NC_{SQ}), com volume final de 10 mL.

Para o revestimento a quitosana (0,07 g) foi dissolvida em 10 mL de solução a 1% de ácido acético. A solução de quitosana 0,7% (p/v) foi gotejada sob agitação magnética (em torno de 600 RPM) na NC_{SQ} na proporção solução de quitosana/suspensão de 1:9 e mantida em agitação por 1 hora a temperatura ambiente, para obtenção da suspensão de nanocápsulas revestidas (NC_{CQ}). O esquema ilustrativo da obtenção da NC_{CQ} está apresentado na Figura 4.

Para as análises microbiológicas, todos os utensílios passíveis de aquecimento, foram autoclavados, já aqueles que não foram possíveis a autoclavagem, foram higienizados com etanol 70° GL. As amostras foram utilizadas o mais rápido possível após a preparação, a fim de reduzir ao máximo a carga microbiana.

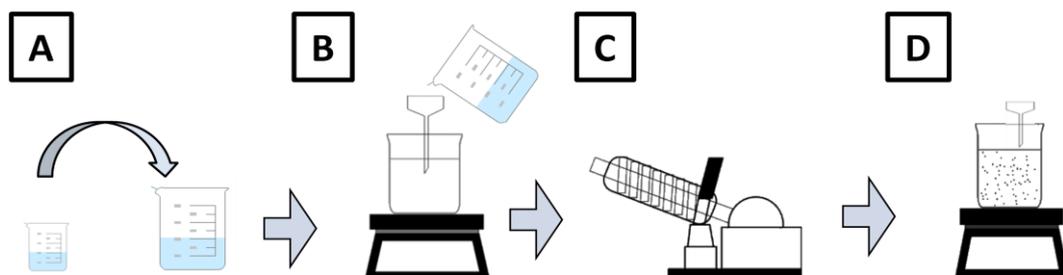


Figura 4: Processo de obtenção da suspensão de nanocápsulas. A: Mistura da solução etanólica a solução de acetona. B: Injeção da fase orgânica na fase aquosa. C: Rota-evaporação dos solventes. D: Revestimento com solução de quitosana.

4.2.2 Preparação dos controles: triclosan livre (T_{livre}), α -bisabolol livre (α_{livre}), emulsão de α -bisabolol e triclosan ($T\alpha_{\text{livre}}$) e nanocápsulas brancas (NC_{BR})

Para solubilizar em água triclosan e α -bisabolol, que possuem um coeficiente de partição água-óleo muito elevado ($\text{LogD} = 5,17$ e $5,07$, respectivamente), foi utilizado polissorbato 80, na mesma concentração final que na suspensão de nanocápsulas ($0,0069$ g/mL). Cada substância foi alicotada (triclosan = $0,09$ g e α -bisabolol = $0,160$ μL) e colocada em um gral, em seguida o polissorbato 80 ($0,077$ g) foi adicionado, a mistura foi homogeneizada com um pistilo e a água MilliQ[®] (10 mL) adicionada aos poucos, até a completa dispersão, obtendo-se o $T\alpha_{\text{livre}}$. Para obtenção do T_{livre} ou α_{livre} , o processo foi o mesmo do $T\alpha_{\text{livre}}$, excetuando a presença do triclosan, para o α_{livre} , ou o α -bisabolol para o T_{livre} .

A suspensão de NC_{BR} foi obtida da mesma forma que a de NC_{CQ} , como descrito no item 4.2.1, substituindo-se o α -bisabolol por triglicerídeos de cadeia média (TCM) e excluindo-se o triclosan da formulação. Assim como para as suspensões de nanocápsulas, os utensílios foram previamente esterilizados para redução da carga microbiana presente na amostra.

4.2.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas:

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas através da determinação do diâmetro de partícula, ausência de contaminantes

micrométricos, índice de polidispersão, potencial zeta da superfície, pH da suspensão, eficiência de encapsulação, quantificação, perfis de liberação, morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e densidade de número de partículas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.3.1 Ausência de contaminantes micrométricos, tamanho das partículas e índice de polidispersão (PDI)

As formulações foram analisadas pela técnica de difração de laser por via úmida (Hydro 2000, Mastersizer 2000[®], Malvern, Worcestershire, Reino Unido) com água destilada, com intuito de verificar a presença de partículas micrométricas contaminantes (possíveis aglomerados de nanocápsulas), assim como para determinar o diâmetro médio das partículas baseado no volume (D[4,3]) e sua dispersão (*span*) (Equação 1). Para as leituras foi utilizado o índice de refração da quitosana (1,345) (Schatz *et al.*2003).

Constatada a ausência de contaminantes micrométricos, foi procedida a análise de distribuição de tamanho de partículas e índice de polidispersão através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (ZetaSizer[®], Nano-ZS Modelo ZEN 3600, Malvern, Inglaterra), a qual define com maior precisão o diâmetro médio das partículas e a polidispersão das mesmas. As análises foram realizadas a 25°C, com o ângulo do detector de 173°.

Equação 1:

$$span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}}$$

4.2.3.2 Potencial Zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi determinado através da análise da mobilidade eletroforética das partículas (Zetasizer[®], Nano-ZS Modelo ZEN 3600, Malvern, Inglaterra), após as formulações serem diluídas (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada

através de membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro. As análises foram realizadas a 25°C e em triplicata de lote.

4.2.3.3 Análise de pH

O pH foi determinado pela técnica de potenciometria (B474, Micronal, São Paulo, Brasil). As medições foram realizadas diretamente nas formulações contendo suspensões de nanocápsulas antes e após os revestimentos. Também foram analisadas amostras da solução de NaCl (10 mM), utilizada para medições do potencial zeta, além de suspensões de NC_{CCQ} diluídas conforme item 3.2.3.2. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.2.3.4 Eficiência de Encapsulação (EE%)

A técnica para determinação da EE% foi de ultrafiltração-ultracentrifugação, na qual se utilizaram Ultrafree-MC[®] (Millipore, Bedford, USA) de 10.000 Daltons. Nesta técnica o triclosan não encapsulado presente na suspensão de NC_{CCQ}, após uma centrifugação a 5.000 r.p.m. por 10 minutos, passa para o ultra-filtrado, sendo posteriormente quantificado por CLAE. Por sua vez, as nanocápsulas ficam retidas no filtro, assim como o triclosan nanoencapsulado. Determina-se a taxa de associação (EE%) de forma indireta, aplicando a Equação 2, na qual T é o teor e UF é a quantidade de triclosan doseado no ultra-filtrado (Paese *et al.*, 2009).

Equação 2

$$EE\% = \frac{(T-UF)}{T} \times 100$$

4.2.3.5 Teor

A concentração de triclosan a partir das suspensões de nanocápsulas foi determinada através da extração em acetonitrila sob agitação de 30 minutos no ultrassom, seguido de filtração em filtro de 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) com os parâmetros de acordo com o Anexo 1. O doseamento do triclosan no (T=0) e (T=30 dias) foi utilizado para determinar a estabilidade da formulação durante um mês.

4.2.3.6 Liberação em saco de diálise

O perfil de liberação do triclosan da suspensão de NC_{CQ} foi avaliado em meio de dissolução etanol:água (1:1, v/v). Este meio foi o de escolha por ser o capaz de manter a condição *sink* tanto para α-bisabolol, como triclosan. As amostras (1,5 mL) foram colocadas em sacos de membranas de acetato de celulose 25 mm (*cut off* 14.000 Da) (Sigma-Aldrich®) seladas e imersas em meio receptor (200 mL) sob agitação magnética constante (600 RPM). O perfil de liberação foi traçado com tempos de coleta de 10, 30 e 60 minutos, 3, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas. A cada intervalo foi retirado uma alíquota do meio receptor, filtrada em filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore® Millex-HV) e doseado por CLAE, de acordo com os parâmetros descritos no Anexo 1. A modelagem matemática (MicroMath Scientist®, version 2.01, St. Louis, MO, USA) foi utilizada para analisar os perfis de liberação do utilizando os modelos monoexponencial e biexponencial (Fontana *et al.*, 2009).

4.2.3.7 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

Para a análise da morfologia das nanocápsulas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), com um microscópio de transmissão JEM 1200 ExII, operado a 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil). O preparo das amostras se deu através da diluição

das suspensões de nanocápsulas no valor de 10 vezes (v/v) em água MilliQ[®]. Em seguida cada amostra foi depositada sobre um *grid*, de aproximadamente 200 mesh composto de cobre e revestido por um filme de absorção de elétrons de Formvar-Carbono (Electron Microscopy Sciences). As amostras ficaram em contato com os *grids* por 1 minuto, após o qual o excesso foi retirado com auxílio de papel filtro. Os *grids* então foram metalizados com a adição de solução de acetato de uranila a 2% (m/v) previamente filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore[®] Millex-HV), permanecendo em contato por 1 minuto. Após esse período o excesso da solução foi removido com auxílio de um novo papel filtro. As amostras ficaram em repouso no dessecador por 24 horas até a análise. As magnitudes utilizadas para as análises microscópicas foram 50.000, 100.000 e 200.000 vezes.

4.2.3.8 Densidade de número de partículas

A densidade do número de partículas foi determinada através da turbidimetria de acordo com Poletto e colaboradores (2008). As amostras foram diluídas em água MilliQ[®] filtrada, em filtro de 0.45 µm de diâmetro de poro, em cinco concentrações diferentes (20, 40, 60, 80 e 100 µL em 10 mL de água). Para as análises foi utilizado espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian, USA) em um comprimento de onda em que os fármacos não absorviam ($\lambda = 395$ nm).

4.2.4 Atividade antimicrobiana das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas tiveram sua atividade antimicrobiana testada através de microdiluição seriada, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e teste desafio, no qual foi testada a atividade da suspensão de NC_{CQ}, assim como a mesma impregnada em curativo de hemicelulose. As atividades antimicrobianas das formulações foram testadas frente as cepas de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), já

para levedura foi utilizada a cepa de *Candida albicans* (ATCC 24433) (Maillard *et al.*, 1998, Messenger *et al.*, 2001 e Lboutounne *et al.*, 2002).

4.2.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias

A microdiluição seriada com detecção de turbidimetria foi à técnica de escolha para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias. Esta é uma técnica que pode ser aplicada a todas as cepas bacterianas do estudo, metodologia similar já foi utilizada para avaliação de nanopartículas metálicas (Jones *et al.*, 2007).

Em bactérias a metodologia de preparação do inóculo foi a de suspensão direta, descrita pelo guia da CLSI (2003). Brevemente, entre 3-5 colônias eram raspadas da placa de ágar Mueller Hinton (previamente incubada com a cepa por 24 horas à 37°C) e suspensas em solução salina. Esta teve a turbidez ajustada para entre 0,08 e 0,10 de absorvância em espectrofotômetro (Femtom 600 Plus) com $\lambda=625$ nm, a fim de obter o equivalente a 0,5 McFarland. Após o preparo do inóculo concentrado ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/mL), este foi diluído na razão de 1:100 em caldo Mueller Hinton, para obtenção da concentração intermediária do inóculo ($\approx 1 \times 10^6$ UFC/mL), que com a diluição no poço da microplaca na razão de 1:1, atinge a concentração adequada para o teste de CIM ($\approx 5 \times 10^5$ UFC/mL).

Após a preparação do inóculo, as placas de 96 poços foram preenchidas de acordo com a Figura 5. Na primeira coluna, com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 200 μ L da amostra a ser analisada, as colunas subsequentes foram preenchidas com 100 μ L de caldo Mueller Hinton, com exceção da última, a qual adicionou-se 200 μ L, pois se tratava do controle negativo do meio (C-). Para iniciar a diluição, 100 μ L da primeira coluna foi retirado e transferido para a segunda coluna, seguido de homogeneização com a própria micropipeta, então 100 μ L desta foi transferido para a terceira, repetindo o processo sucessivamente até a antepenúltima coluna, diluindo a concentração pela metade a cada transferência. Ao final das diluições foram adicionados 100 μ L do inóculo intermediário em todas as colunas, com exceção da última (C-).

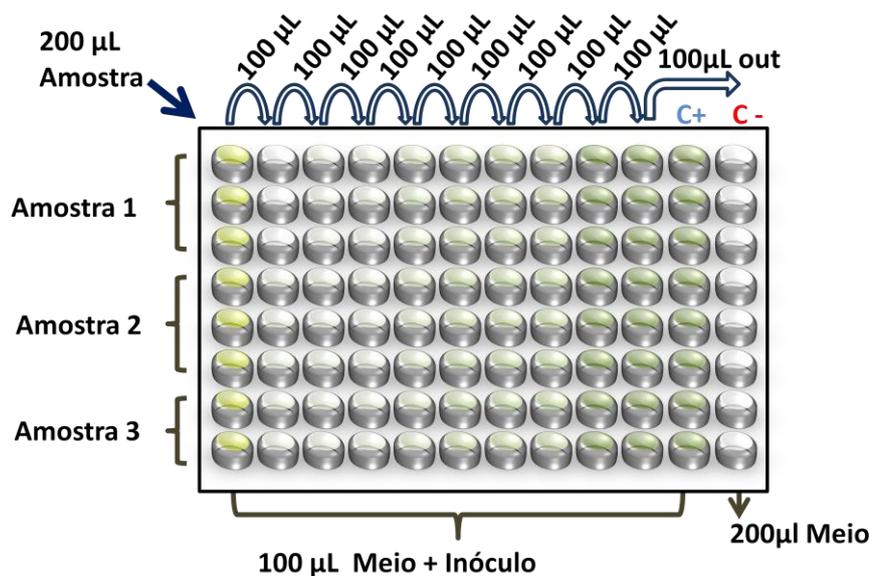


Figura 5: Esquema de preenchimento da placa de microdiluição seriada, onde C+ é o controle positivo de crescimento e C- o controle do meio.

Após o preparo, as placas com as amostras e inóculo foram imediatamente levadas ao espectrofotômetro de placas (Spectramax, USA) ($\lambda=625$ nm) para a medida da turbidimetria inicial (T_0) da amostra com o inóculo no tempo zero. As placas foram então deixadas em estufa por 24 horas a 37°C . Após esse período, a turbidez foi novamente verificada (T_{24}) e o resultado subtraído pelo do dia anterior, para verificar se houve aumento da turbidez, sinal de crescimento bacteriano (C_B) no poço em análise, conforme a Equação 3. Foram testadas suspensões de nanocápsulas contendo os fármacos (triclosan e α -bisabolol), antes e após o revestimento (NC_{SQ} e NC_{CQ}), nanocápsulas brancas (NC_{BR}) e os fármacos livres (T_{livre} e α_{livre}). Todas as análises foram feitas em triplicata e o MIC determinado através de análise estatística.

Equação 3:

$$C_B = T_{24} - T_0$$

4.2.4.2 Microdiluição seriada para leveduras

Nas leveduras o inóculo foi obtido pela técnica de suspensão direta, como descrita no guia da CLSI no documento M27–A3 (CLSI, 2008). Brevemente, alíquotas de levedura foram raspadas e suspensas em solução salina, a turbidez foi ajustada para 90% de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda=530$ nm), a fim de obter o inóculo concentrado (entre 0.5×10^5 a 2.5×10^5 UFC/mL). Este foi diluído em solução salina na proporção de 1:50 obtendo o inóculo intermediário, que por sua vez foi novamente diluído em meio RPMI 1640 na proporção 1:20 obtendo o inóculo final ($0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL).

Para obtenção do CIM de *C. albicans*, não foi possível a utilização da técnica de turbidimetria, pois esta apresenta problemas mediante a formação de botões, assim como a contagem de colônia não é efetiva após a agregação celular (Jahn *et al.*, 1995). Para tanto foi utilizado um método de detecção de viabilidade celular, através da redução de sais do tetrazólio e formação do formazam (MTT), o qual tem sido utilizado para determinação da atividade de diversos antifúngicos (Jahn *et al.*, 1995; Meletiadis *et al.* 2000). Basicamente, após a obtenção do inóculo, a microplaca era preenchida similarmente ao item 4.4.2.1, substituindo o caldo de cultura Mueller-Hinton por caldo RPMI 1640. Terminadas as diluições seriadas da amostra em caldo, o inóculo (100 μ L) foi adicionado à placa e esta incubada por 48 horas em estufa a 35°C.

Após a incubação as placas foram retiradas da estufa e processadas de acordo com a técnica de MTT adaptada de Meletiadis e colaboradores (2000), que consistia em retirar o sobrenadante (150 μ L) de todos os poços analisados, repor a mesma quantidade de caldo RPMI 1640 com MTT, deixando em contato por três horas em estufa 32°C. Terminado o tempo de contato, o sobrenadante (150 μ L) foi novamente retirado do poço e adicionado isopropanol (150 μ L), seguido de homogeneização para a completa extração do corante. O sobrenadante (150 μ L) foi transferido para uma nova placa de 96 poços, a qual foi lida em espectrofotômetro de placas (Spectramax, USA) nos comprimentos de onda de 570 nm (AB_{570}) e 690 nm (AB_{690}), deduzindo o valor do segundo (interferentes da placa) do primeiro, para obtenção do valor de absorvância (AB). Os resultados das amostras ($AB_{A570} - AB_{A690}$) foram

comparados com o controle positivo ($AB_{C570} - AB_{C690}$) e expressos em porcentagem (Equação 4) de acordo com Pippi e colaboradores (2015).

Equação 4:
$$AB = [1 - (AB_{A570} - AB_{A690}) / (AB_{C570} - AB_{C690})] \times 100$$

4.2.4.3 Determinação do número de nanocápsulas por bactéria

A determinação da densidade de partículas, descrita no item 3.2.3.8, possibilitou estimar o número de partículas presentes em cada poço de diluição. Através da relação número de nanocápsulas com o número de bactérias (pré-determinadas) no inóculo, descrita no item 3.2.4.1, foi possível obter a relação nanocápsulas/bactéria pela Equação 5. Onde (R) é a razão entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) e nanopartículas, N_{UFC100} o número de UFCs em 100 microlitros de inóculo, a 0,5 MacFarland e NP_{100} o número de partículas em 100 microlitros da suspensão NC_{CQ} .

Equação 5:
$$R = \frac{N_{UFC100}}{NP_{100}}$$

4.2.4.4 Determinação do potencial zeta de bactérias

O potencial zeta (carga de superfície) das bactérias foi determinado para verificar se há alteração do mesmo em presença das NC_{CQ} , que são catiônicas. A técnica utilizada foi similar à descrita no item 3.2.3.2, com substituição das amostras, ao invés de suspensão de nanocápsulas, foram analisados as seguintes condições, inóculo sozinho e inóculo com suspensão de NC_{CQ} (1:1), simulando uma diluição seriada. A cepa bacteriana analisada foi de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), a qual, após o contato com a

nanocápsula, foi deixada em repouso por meia-hora. A metodologia utilizada foi adaptada de Neumann e colaboradores (2006) e Shamim & Rehmam (2014).

4.2.4.5 Teste desafio

A técnica do teste desafio (*Challenge Test*) foi a de escolha para a verificação dos resultados obtidos na microdiluição seriada, assim como comprovar a manutenção dos efeitos antimicrobianos na suspensão seca por aspersão em curativos de hemicelulose. A metodologia utilizada foi a descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), a mesma consiste na contaminação intencional da amostra em análise (suspensão de NC_{CQ} e NC_{CQ} incorporada ao curativo), previamente diluída na proporção de 1:9 (tampão cloreto de sódio peptona, pH entre 6-8), com uma alíquota (100 µL) de suspensão ($\approx 1,5 \times 10^6$ UFC/mL) da cepa a ser analisada Tabela 1. Em tempos pré-determinados (24 horas, 7, 14, 21, 28 dias) de contato (micro-organismo amostra) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, foram retiradas alíquotas e plaqueadas em placas com meio de cultura específico (Tabela 1). As placas para cepas de bactérias foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por dois dias, enquanto que as contendo leveduras foram mantidas a $25-30^\circ\text{C}$ por 5 dias. Após esse período foi realizado a quantificação visual. Para uma maior segurança dos resultados, as análises de teste desafio foram terceirizadas com a empresa Pró-ambiente (Porto Alegre, Brasil).

Tabela 1: Cepas analisadas e meios de cultura utilizados para cada micro-organismo.

Cepa Analisada	Meio de Cultura
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Ágar MacConkey
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ágar Baird Parker
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ágar Cetrimide
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Ágar Batata Glicosado

4.2.5 Análises Cutâneas

Foram realizadas análises de permeação/penetração cutânea em pele abdominal de porcos fêmea, assim como lavabilidade do tecido frente à aplicação da suspensão de nanocápsulas.

4.2.5.1 Permeação/penetração Cutânea

A permeação/penetração cutânea foi avaliada utilizando o equipamento de células de Franz automatizado. Foi utilizada pele abdominal de porcas fêmea obtidas de abatedouro e imediatamente limpas, processadas, medidas a espessura e congeladas a -5°C , até posterior uso.

Os experimentos de absorção dérmica foram conduzidos em equipamento de células de Difusão de Franz automatizada (Microetteplus, Hanson), onde uma triplicata foi utilizada para cada condição testada. O meio receptor utilizado etanol:água (1:1 v/v) foi escolhido de acordo com a concentração de saturação do fármaco no mesmo (Terroso, 2014), o qual foi mantido sob agitação magnética de 400 rpm a $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 6). Foram depositados 300 μL de amostra sobre a pele, as quais possuíam espessuras entre 1,8 a 2,0 mm. O tempo de o contato foi de 24 horas, após o qual, o conjunto, formulação + pele foi retirado do aparelho, o excesso de formulação presente no compartimento doador removido com auxílio de algodão. A separação do estrato córneo se deu pela técnica de *tape stripping* com 18 fitas adesivas (Scocht 3M), já as demais camadas (derme e epiderme) através de banho de água morna (60°C por 45 segundo) e subsequente raspagem com espátula. O triclosan foi extraído das diferentes camadas da pele com acetonitrila e agitação em vortex por 2 minutos, seguido de ultrassonicação por 30 minutos e quantificado pelo método de CLAE. As amostras analisadas foram triclosan livre ($T\alpha_{\text{livre}}$) e nanocápsulas revestidas (NC_{CQ}), e o meio receptor utilizado consistiu de solução etanol-água na proporção de 1:1, garantindo condição *sink*.

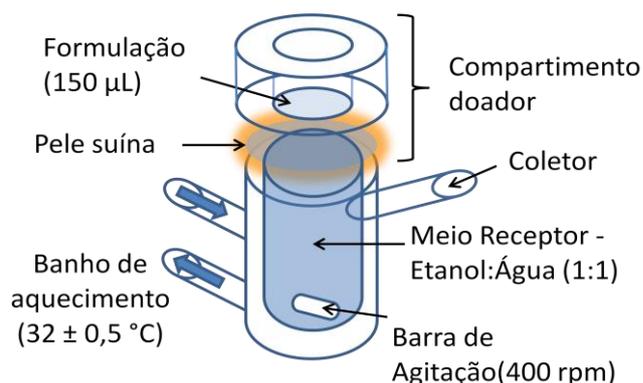


Figura 6: Esquema de disposição dos componentes presentes na célula de Franz.
4.2.5.2 Teste de lavabilidade (*washability*)

Este ensaio foi realizado para verificar a capacidade de retenção do triclosan no local de ação (pele) pelas suspensões de nanocápsulas, frente ao fármaco livre. Para o experimento foi utilizada uma célula de Franz modificada Figura 7, na qual foram colocadas, entre o compartimento de lavagem e o receptor, amostras de pele abdominal de porcas fêmeas sem o estrato córneo, para simular uma pele danificada por uma queimadura de segundo grau. Sobre essa pele, foi aplicada uma alíquota (150 µL) da amostra a ser analisada e deixada em contato por 15 minutos. Após esse período foi iniciada a passagem da solução de lavagem, que consistia em etanol:água (1:1 v/v) com fluxo de 1 mL/minuto. As amostras foram retiradas e filtradas em filtro de 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) para subsequente quantificação em CLAE. Os tempos de coleta foram de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 minutos e as amostras analisadas fora Ta_{livre} , suspensão de NC_{SQ} e suspensão de NC_{CQ} . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

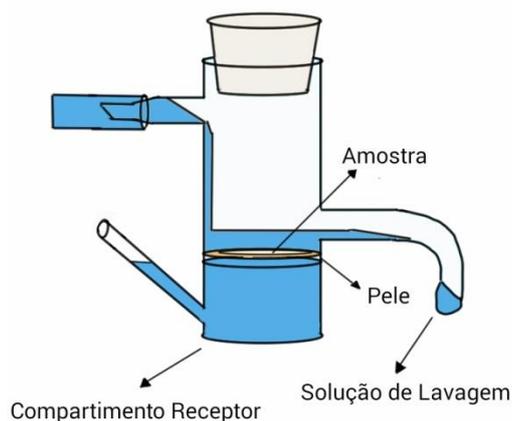


Figura 7: Célula de Franz modificada utilizada para o experimento de lavabilidade.

4.2.6 Incorporação das nanocápsulas ao Veloderm[®]

As películas de hemi-celulose (Veloderm[®]) foram pesadas antes e após serem borrifadas com suspensão de NC_{CCQ} e secas a temperatura ambiente em local protegido do vento. Após 24 horas as nanocápsulas associadas aos curativos foram extraídas e quantificadas em CLAE utilizando metodologias previamente validadas, descritas no Anexo 2.

4.2.7 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de permeação e penetração e liberação foram analisados estatisticamente através de comparações múltiplas usando ANOVA One-Way e Bonferroni como pós-teste a um nível de probabilidade de 0.05. Para comparações um a um foi utilizado teste T de student pareado com o mesmo nível de probabilidade. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5.0. Nos gráficos as barras de desvio se referem ao erro padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação e caracterização físico-químicas

5.1.1 Suspensões de nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação por deslocamento de solvente, utilizando uma proporção de solventes, acetona e água, inédita (dados não publicados) e apresentando uma nova associação de fármacos, triclosan e α -bisabolol. A suspensão apresentou uma característica branca leitosa com um reflexo azulado, resultado do efeito Tyndal, sem formação de precipitado ou separação de fases.

O perfil de distribuição granulométrico por volume utilizando difração de laser (Mastersizer 2000[®], Malvern, Reino Unido) mostrou ser unimodal, sem a presença de picos micrométricos, como visto na Figura 8, com uma média de distribuição de diâmetro por volume (D[4,3]), similar às observadas no *Z-average* do retroespalhamento de luz dinâmico. Os resultados de PDI e span mostraram um perfil de distribuição homogêneo das formulações (Tabela 2). O potencial zeta analisado nas suspensões antes (NC_{SQ}) e após o revestimento (NC_{CQ}) mostrou uma destacada influencia do revestimento de quitosana sobre a carga de superfície das partículas, passando de aniônicas (-15,3±2,98 mV em 1,37±0,07 mS/cm de condutividade) para catiônicas (+13,67±0,35 mV em 1,38±0,06 mS/cm de condutividade); resultados similares também foram observados por Bender e colaboradores (2012) para nanocápsulas de núcleo lipídico antes e após o revestimento com quitosana.

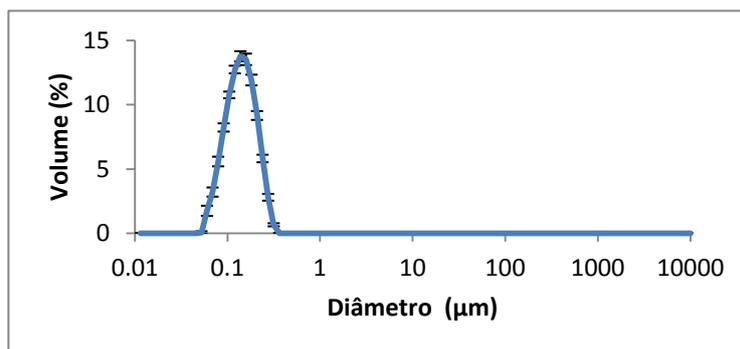


Figura 8: Perfil de distribuição granulométrica das nanocápsulas de α -bisabolol, revestidas com quitosana, veiculando triclosan.

Tabela 2: Resultados das análises de diâmetro e polidispersão.

Formulação	D[4,3] (nm)	Z-average (nm)	Span	PDI
NC _{CQ}	137 \pm 1,5	144 \pm 2	0,984 \pm 0,03	0,133 \pm 0,019

O pH apresentado pelas suspensões de nanocápsulas variou entre as suspensões sem revestimento ($7,04 \pm 0,17$) e com revestimento de quitosana ($4,09 \pm 0,1$), revelando uma pronunciada influência do ácido acético (1%) presente na composição da solução de quitosana (0,7%) sobre o pH. Esta redução de pH entre suspensões sem revestimento e com revestimento de quitosana, também foi observada por Bender e colaboradores (2012). Os valores de pH para a solução de NaCl (10 mM) e da suspensão de NC_{CQ} diluída na mesma foram de ($7,06 \pm 0,06$) e ($5,59 \pm 0,06$), respectivamente. Esta elevação do pH pode representar um interferente nas medições do valor do potencial zeta, uma vez que a densidade de cargas da quitosana é dependente do pH (Singla & Chawla, 2001) com pKa \approx 6-6,5 (Pajuna *et al.*, 2012).

O teor de triclosan para as NC_{CQ} foi de $0,86 \pm 0,02$ mg/mL, próximo ao valor teórico de 0,9 mg/mL. Após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, os mesmos lotes apresentaram teores médios de $0,82 \pm 0,01$, não havendo diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os dois resultados, representando 94,67% do teor inicial (Fig. 10). A eficiência de encapsulação (EE%) foi próxima a 100% para o triclosan, nenhum pico pode ser observado ($\lambda=280$), dentro do limite de detecção do método empregado, no tempo de retenção de 4,2 minutos, conforme mostra a Figura 9. Os resultados

da EE% e o teor, próximo ao teórico, corroboram com o modelo de distribuição do fármaco proposto por Oliveira e colaboradores (2013), no qual fármacos com LogD próximo de 5 teriam toda sua distribuição no núcleo e parede da nanocápsula.

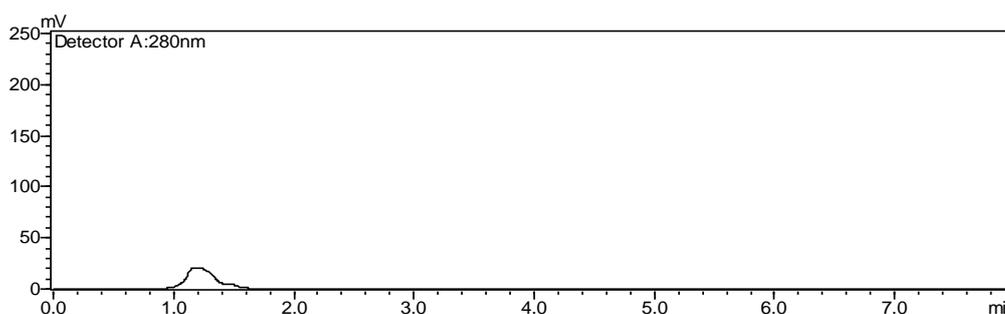


Figura 9: Cromatograma de uma das leituras do ultra-filtrado, mostrando a ausência do pico referente ao triclosan.

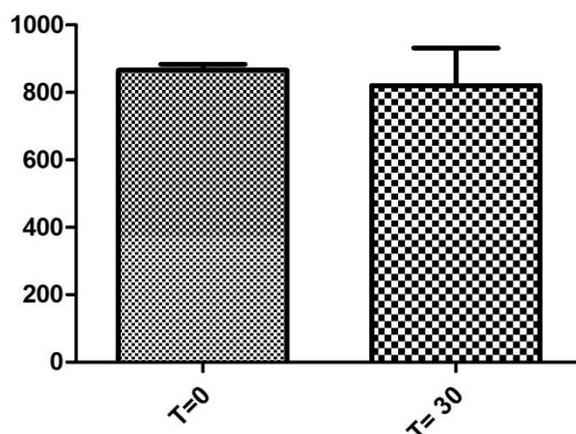


Figura 10: Teor do triclosan no tempo 0 (T=0) e após 30 dias (T=30). Valor referente a massa total de uma suspensão de 10 mL.

Para selecionar a formulação de triclosan livre, a ser utilizada no ensaio de liberação, e que serviria de modelo de comparação com a suspensão de nanocápsulas, foram realizados ensaios preliminares com dois diferentes tipos de formulações: triclosan solubilizado, em etanol ou em polissorbato 80 (7,7 mg/mL). Os perfis de liberação do triclosan a partir das duas formulações foram muito semelhantes (Fig. 11), não havendo diferença estatística significativa em

nenhum dos pontos de coleta. Assim, foi selecionado o fármaco solubilizado em etanol, por apresentar uma maior facilidade metodológica na preparação.

A comparação entre os perfis de liberação do triclosan para o meio a partir da suspensão de nanocápsulas frente ao triclosan livre, mostrou certa retenção do mesmo quando nanoencapsulado (Fig. 12). O fármaco livre apresenta uma dissolução inicial mais rápida $\approx 50\%$ em 270 minutos (4,5 horas) de experimento e atinge o platô em 1080 minutos (18 horas). Por sua vez, o triclosan presente nas nanocápsulas é liberado mais progressivamente, $\approx 50\%$ do fármaco liberado em 720 minutos (9 horas), seguindo na mesma velocidade de liberação, até atingir o mesmo platô em 2160 minutos (36 horas). Este resultado confirma a liberação gradual e sustentada a partir das nanocápsulas, o que pode contribuir para uma maior manutenção do fármaco no sítio de ação por um maior período de tempo.

A modelagem matemática do perfil de liberação do fármaco permitiu determinar o tipo de modelo, monoexponencial ou biexponencial. O modelo que mais se adequou ao perfil de liberação foi o monoexponencial (Fig. 13), comprovando uma liberação progressiva e sustentada do fármaco por difusão da nanocápsula para o meio.

A modelagem matemática foi utilizada para analisar a liberação do triclosan e cada perfil foi modelado utilizando as equações monoexponencial e biexponencial. As Tabelas 1.4 e 1.5 apresentam os valores de velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) para o modelo monoexponencial, uma vez que as formulações não puderam ser modeladas pela equação biexponencial.

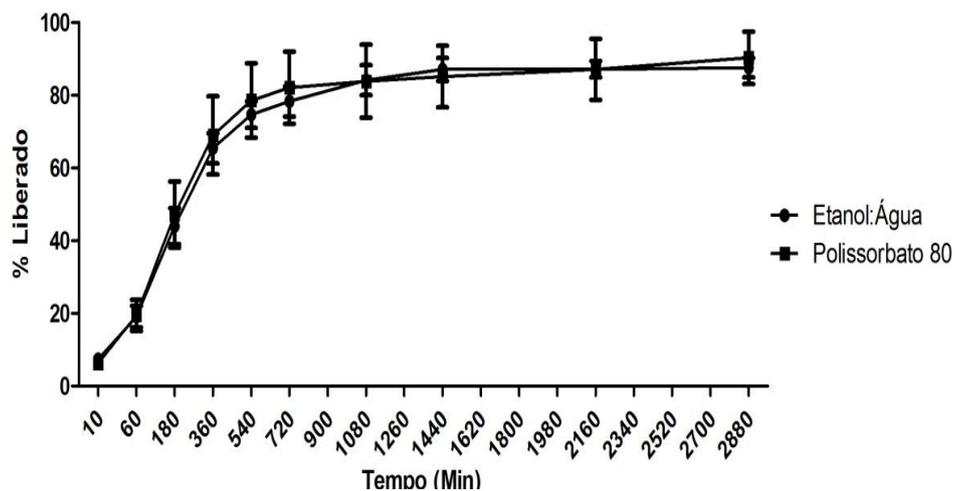


Figura 11: Comparação do perfil de liberação do triclosan livre em meio receptor etanol:água (1:1), através da técnica de diálise, (n=3).

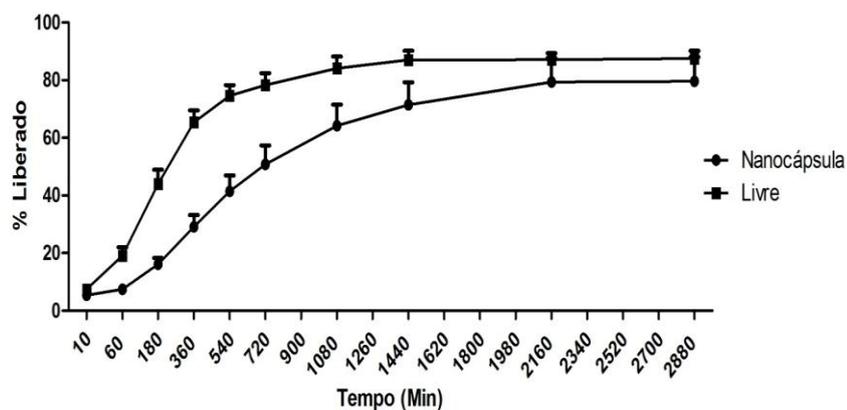


Figura 12: Perfis de liberação do triclosan da nanocápsula (NC_{CQ}) e livre (T_{livre}) em meio receptor etanol:água (1:1 v/v), através da técnica de diálise, (n=3).

Tabela 3: Valores velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (min) e tipo de distribuição.

Formulação	K	$T_{1/2}$	Distribuição
Suspensão de NC_{CQ}	$0.0009168 \pm$ 0.000326	755.89	Monoexponencial

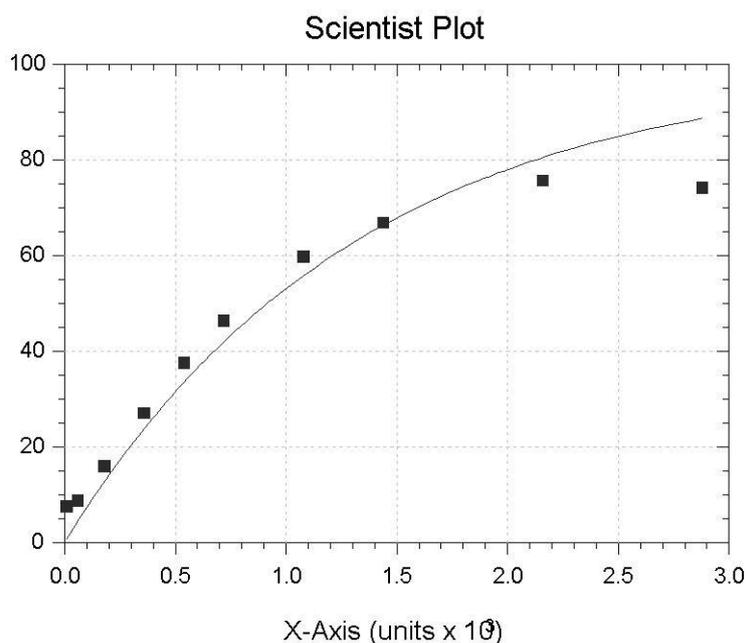


Figura 13: Modelagem matemática monoexponencial do perfil de liberação do triclosan encapsulado para o meio. Eixo X é igual ao tempo (min) e o eixo Y a porcentagem.

A avaliação das nanocápsulas em microscopia eletrônica de transmissão confirmou o tamanho médio obtido pelas técnicas de difração de laser e retroespalhamento de luz dinâmico. As nanocápsulas se mostraram com um formato esférico regular, com maior densidade ao redor da parede das NC_{SQ} (Fig. 14) do que as NC_{CQ} (Fig. 15). Essa menor densidade da parede das NC_{CQ} pode estar relacionada à presença da quitosana, a qual se liga as cargas negativas de superfície da NC_{SQ}, reduzindo a disponibilidade para a ligação da uranila, que é catiônica e responsável pela pigmentação da amostra. A presença da quitosana também pode ser deduzida pelas franjas formadas ao redor da parede polimérica das NC_{CQ}.

A técnica de determinação da densidade de partículas resultou em um coeficiente de reta de 0,9986 para as diferentes diluições (Fig. 16) e número de $7.88 \pm 0,96$ ($\times 10^{13}$ partículas cm^{-3}), este número é 10x maior que o observado em trabalhos semelhantes, os quais estudaram nanocápsulas de núcleo lipídico (Poletto *et al.*, 2012; Terroso, 2014). A diferença no número de partículas pode estar relacionada com o diâmetro das mesmas, as quais eram aproximadamente 100 nm maiores, nos estudos em questão.

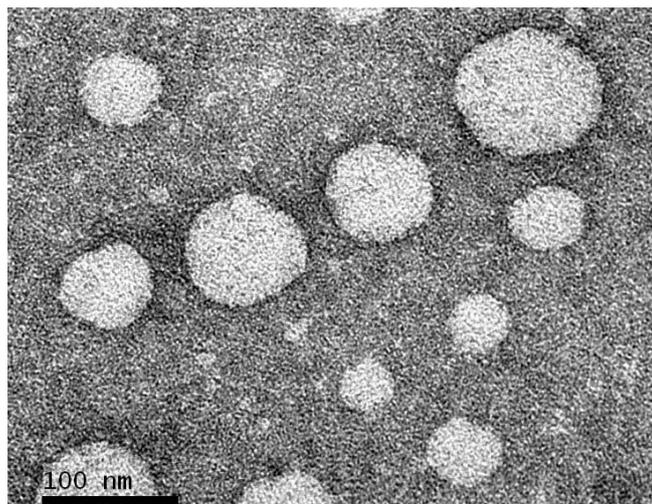


Figura 14: MET da suspensão de NC_{SQ}, mostrando superfície regular com margens pigmentadas.

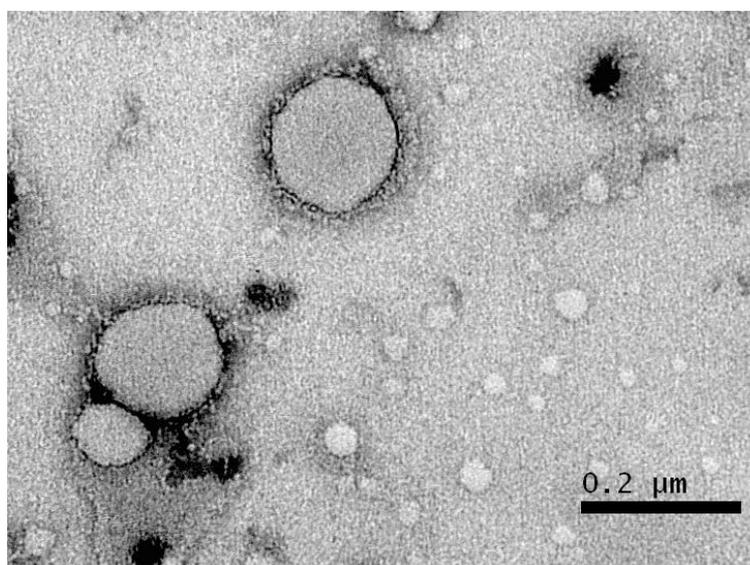


Figura 15: MET da suspensão de NC_{CQ}, mostrando superfície irregular com franjas.

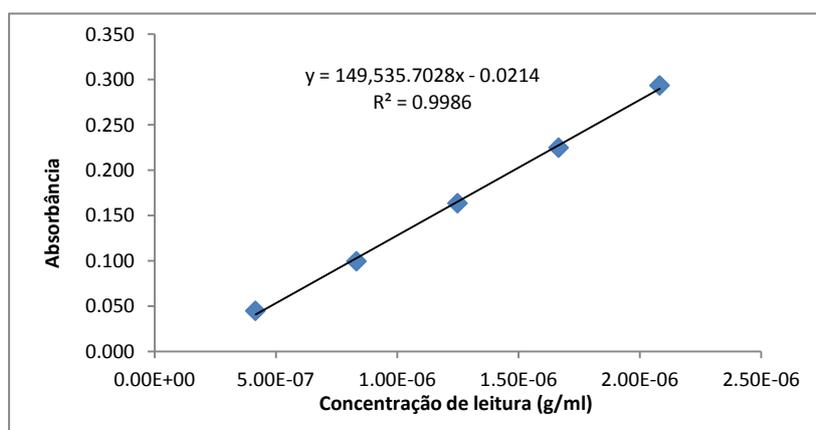


Figura 16: Curva de calibração em espectrofotômetro da absorção em diferentes concentrações da suspensão de NC_{CQ}. Resultado em triplicata.

5.1.2 Triclosan e α -bisabolol livres

Foi obtida uma suspensão transparente e incolor para o triclosan livre (T_{livre}), enquanto que uma suspensão leitosa para o α -bisabolol livre (α_{livre}) e α -bisabolol com triclosan ($T\alpha_{livre}$). A escolha do polissorbato 80 para obtenção dos fármacos livres se deu devido à presença do mesmo na suspensão de nanocápsulas, assim sendo, qualquer possível efeito do tenso-ativo também estaria presente na formulação de fármaco livre. A suspensão de NC_{BR} apresentou características semelhantes à de NC_{CQ} , como aspecto leitoso, efeito Tyndal, potencial zeta antes do revestimento ($-15,3 \pm 2,78$ mV em condutividade $1,37 \pm 0,07$ mS/cm) e após o revestimento de quitosana ($13,7 \pm 0,45$ em condutividade $1,38 \pm 0,06$ mS/cm), diâmetro ($141,6 \pm 6$ nm) e PDI (0,140).

O dimetil sulfóxido (DMSO), comumente utilizado para diluição de fármacos pouco hidrossolúveis, tem sido relatado como um possível interferente em análises de CIM, pois se liga a membrana celular de microorganismos, desestabilizando-a e aumentando a sua permeabilidade (Hazen, 2013). O polissorbato 80 também é indicado em testes de CIM em microplacas de fundo chato, pois evita a adsorção do fármaco (hidrofóbico), as paredes plásticas do poço de análise (Farrell *et al.* 2014).

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os CIMs obtidos para o triclosan livre (T_{livre}), α -bisabolol livre (α_{livre}), suspensão de nanocápsulas sem revestimento (NC_{SQ}) e suspensão de nanocápsulas com revestimento (NC_{CQ}) estão descritos na Tabela 3. Os CIMs foram os menores valores de concentração em que não havia diferença estatisticamente significativa entre a absorção observada para o tempo 0 e para o tempo de 24 horas de inoculação.

Para efeito comparativo, na Tabela 3 também foram adicionados os CIMs de triclosan em DMSO (T_{DMSO}) retirados da literatura (Koburger *et al.* 2010), assim como valores para nanopartículas de quitosana (NPQ) em pH 5 (Qi *et al.*, 2004). Para T_{livre} , T_{DMSO} , NC_{SQ} e NC_{CQ} , foram consideradas as concentrações de triclosan, para α_{livre} , a concentração de α -bisabolol, já para as NC_{BR} foram considerados os valores teóricos de concentração que o triclosan teria, se estivesse presente na formulação.

Para leveduras, o guia da CLSI (2008) determina a seguinte escala de crescimento, quando comparado com o controle positivo (inóculo + caldo, sem antimicrobiano): 4, crescimento pleno; 3, leve redução no crescimento; 2, uma redução proeminente do crescimento ($\approx 50\%$ do controle); 1, leve crescimento ($\approx 25\%$ do controle); e 0, total ausência de crescimento. Neste estudo o ponto de quebra (*breakpoint*) foi considerado o nível superior a 80% de dano celular, ou seja, apenas 20% de crescimento. A fórmula utilizada para obtenção do dano celular foi a seguinte,

Dano celular % = $[1 - (A_{570} - A_{690} \text{ com fármaco}) / (A_{570} - A_{690} \text{ controle positivo})] \times 100$. Os CIMs refletem valores para 48 horas de experimento para a espécie analisada (*Candida albicans* ATCC 24433), enquanto que para as bactérias 24 horas. Os gráficos de absorvância obtidos para o as análises de microdiluição seriada, encontram-se no Anexo 3.

Em quase todas as leituras o triclosan livre (T_{livre}) teve uma maior atividade antimicrobiana que o triclosan em DMSO (T_{DMSO}), a única exceção foi *C. albicans*. Essa maior atividade pode indicar um efeito potencializador do polissorbato 80, uma vez que quando associado a fármaco pouco hidrossolúvel, reduz a ligação do mesmo com as paredes plásticas do poço, permitindo que fique livre pra interagir com as células (Rennie *et al.*, 2007 & Sader *et al.*, 2012).

O α -bisabolol livre (α_{livre}) teve uma atividade antimicrobiana discreta, sendo mais pronunciada frente *C. albicans*, no qual chegou a ser mais efetiva que a suspensão de nanocápsulas sem revestimento (NC_{SQ}) e mostrou o dobro da concentração inibitória, quando comparadas as concentrações de α -bisabolol no α_{livre} e NC_{CQ} (Tabela 4). Em estudo com o óleo da camomila (25 mg/mL), no qual o α -bisabolol se encontrava em concentração de 1 mg/mL, o óleo apresentou ação contra bactérias, principalmente Gram-positivas, e contra

C. albicans (Duke *et al.*, 2002). O α -bisabolol é pouco conhecido por ter ação antimicrobiana, mas sim pelo seu efeito potencializador da ação de outros antibióticos (Brehm-Stecher & Johnson, 2003).

A suspensão de nanocápsulas sem revestimento (NC_{SQ}) mostrou um interessante efeito antibacteriano, sendo mais eficaz que o T_{DMSO} contra todas as cepas bacterianas analisadas. No entanto NC_{SQ} só foi mais efetivo que o T_{livre} contra *P. aeruginosa*, cepa para as quais apresentou uma atividade, ao contrario do fármaco livre. Nanocápsulas de PCL, sem revestimento de quitosana, veiculando clorexidina (0,15%) foram estudadas e tiveram o CIM comparado com a mesma concentração do fármaco em solução. Os resultados mostraram CIMs iguais para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Lboutonne *et al.*, 2002), levando a crer que o revestimento de quitosana tem um importante papel na ação de suspensão de NC_{CQ}.

Os resultados de CIM obtidos para a suspensão de nanocápsulas revestidas com quitosana (NC_{CQ}) mostraram esta ser a apresentação mais efetiva contra quase todas as cepas bacterianas analisadas (Tabela 4). Dentre as bactérias, a única exceção foi a *E. coli*, para a qual o T_{livre} foi mais efetivo do que a NC_{CQ}. Por sua vez, contra *C. albicans* deve-se ressaltar que apesar de ser maior, o valor de CIM do T_{DMSO} se refere ao crescimento 0, na escala da CLSI (2012), enquanto que neste estudo foi adotado o crescimento 1, como padrão de inibição.

Quando testada frente *P. aeruginosa*, a suspensão de NC_{CQ} apresentou inibição de seu crescimento até uma concentração de 56,25 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado é relevante, uma vez que essa espécie possui uma conhecida resistência ao triclosan, mesmo em concentrações de 1 mg/mL (Bhargava & Leonard, 1996), aproximadamente 18 vezes maior, devido bombas de efluxo presentes na bactéria (Chuanchuen *et al.*, 2003; Kumar & Schweizer, 2005; Mima *et al.*, 2007).

Lboutonne e colaboradores (2002) verificaram que as nanocápsulas catiônicas se ligam a superfície da bactéria promovendo uma difusão direta do fármaco para o interior da mesma, potencializando assim o seu efeito. Estudo com nanopartículas catiônicas de Al₂O₃ sugeriu que estas podem ter maior interação com as cargas negativas da membrana celular, devido à carga de superfície, essa característica permitiria uma penetração celular mais efetiva

(Simon-Deckers *et al.*, 2009). A mesma hipótese, corroborada pelo maior efeito quando comparada às NC_{CQ}, NC_{BR} e as NPQ, as quais possuem carga positiva, pode ser levantada para explicar a atividade da primeira. Nesta hipótese, as NC_{CQ} se ligariam as bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e seriam internalizadas, agindo como cavalos de Tróia, conseqüentemente aumentando o efeito antimicrobiano, ou simplesmente, se ligando a superfície do micro-organismo e promovendo uma difusão mais efetiva (Lboutonne *et al.* 2002). O mesmo raciocínio não pode ser aplicado a *P. aeruginosa*, já que seu CIM foi igual ao da NC_{BR}, aparentemente neste caso a NC_{CQ} teve uma ação mais de ligação à superfície (Fig. 18 B e C).

Estudo com nanopartículas de quitosana mostrou inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* nas concentrações de 0,0625 e 0,25 µg/mL, respectivamente, em pH 6,5. No entanto, quando o pH foi reduzido a 5, com 0,25% de ácido acético, os CIM observados foram de 0,03125 e 0,0625 µg/mL, 2 e 4 vezes menores (Qi *et al.*, 2004). Apesar de o ácido acético ser um eficiente agente bactericida em concentrações mais elevadas, como entre 1-5% (Ryssel *et al.*, 2009), o primeiro estudo, associado ao valor de CIM para NC_{BR}, nos leva a crer na influência das cargas positivas de superfície, sobre a eficácia antibiótica. Quanto menor o pH, maior o caráter catiônico da quitosana, fazendo com que haja maior interação entre as nanocápsulas e os micro-organismos, resultando em maior atividade, como pode ser observado na Tabela 4, quando se compara NC_{SQ} e NC_{CQ}, sendo a segunda 8, 4 e 4 vezes mais eficaz contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

É importante ressaltar que a concentração de quitosana inicial presente na suspensão de nanocápsulas com revestimento (NC_{CQ}) é de 700 µg/mL, assim se forem comparados os valores de CIM obtidos, levando em consideração apenas a concentração de quitosana, estes seriam de $6,67 \times 10^{-4}$ e $2,13 \times 10^{-2}$ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Com isso, quando comparados os valores de CIM do NC_{CQ} e NPQ, o primeiro se mostra 187x mais efetivo frente *S. aureus* e 1,46x contra *E. coli*.

Deve ser levado em consideração que os valores de CIM obtidos se referem ao tempo de experimento de 24 (bactérias) e 48 horas (leveduras). Neste período, segundo os resultados de liberação (figura 12), apenas ≈60%

do triclosan foi liberado no meio, podendo o valor de CIM ser menor com a liberação completa.

Tabela 4: CIM do triclosan livre (T_{livre}), α -bisabolol livre (α_{livre}), suspensão de nanocápsulas sem revestimento (NC_{SQ}), suspensão de nanocápsulas com revestimento (NC_{CQ}), suspensão de nanocápsulas brancas (NC_{BR}), triclosan em DMSO (T_{DMSO}) e nanopartículas de quitosana (NPQ) para as diferentes espécies de microorganismos avaliadas. *Valor referente ao CIM₂₅. ** Valor referente à concentração que o triclosan estaria, caso fizesse parte da formulação. *** Valor da concentração de quitosana na formulação.

Formulação	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>C. albicans</i> (ATCC 24433)
T_{livre}	$3,43 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$	>450	>225*
α_{livre}	112,5	225	1800	900*
NC_{SQ}	$6,86 \times 10^{-3}$	0,11	225	>225*
NC_{CQ}	$8,6 \times 10^{-4}$	$2,75 \times 10^{-2}$	56,25	28,125*
NC_{BR}	112,5**	225**	56,25**	-
T_{DMSO}	0,125	4	>512	32
NPQ	0,125***	0,0312***	-	-

Tabela 5: Comparação do efeito antimicrobiano da suspensão de nanocápsulas revestidas (NC_{CQ}) com as diferentes formulações analisadas, frente às espécies microbianas testas. * Para o α_{livre} foi comparada a concentração do α -bisabolol presente na NC_{CQ}. †Valor teórico da concentração de triclosan, caso fizesse parte da formulação.

Espécie	T _{livre}	α_{livre}	NC _{SQ}	NC _{BR}	T _{DMSO}	NPQ
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4x	≈8192x*	8x	1,3x10 ⁵ x†	≈146x	≈187x
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,5x	512x*	4x	8192x†	≈146x	≈1,46x
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8x	2x*	4x	1x†	≈9x	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 24433)	-	2x*	-	-	≈1,14x	-

5.2.2 Determinação do número de nanocápsulas por unidade formadora de colônia (UFC)

Através da determinação do número de partículas na suspensão NC_{CQ} (item 4.1), foi possível obter a correlação do número de nanocápsulas por UFC (Tabela 6). Os resultados refletem os valores para o tempo (T=0), considerando que o micro-organismo ainda não teve tempo suficiente para se replicar (mesma concentração do inóculo) e a concentração de nanocápsulas é reduzida pela metade a cada diluição.

Pode-se observar que mesmo em diluições muito baixas, o R permanece alto. Isso pode resultar em um elevado número de partículas interagindo com a superfície da bactéria, as quais podem inibir o crescimento através da quelagem de elementos traços, desestabilizando a membrana celular e impedindo o transporte de nutrientes essenciais para dentro da célula (Qi *et al.*, 2004). Além disso, interações eletrostáticas são necessárias para a adesão bacteriana (Seil & Webster, 2012) (Fig. 18 C), mas com um número tão elevado de nanopartículas ligadas à superfície da mesma (Tabela 5), esta pode ser reduzida, diminuindo a taxa de fixação (Fig. 18 B). As possíveis explicações para o mecanismo de ação do NC_{CQ} estão resumidas na Figura 18.

Tabela 6: Número de partículas por unidade formadora de colônia (UFC) em cada poço de diluição. NP= Número de partículas, [] = Concentração percentual da suspensão inicial e R = Razão entre o número de partículas e UFC.

[]	50%	25%	12,5%	6,75%	3,12%	1.56%	0.78%	0.39%
NP	7.8×10^{12}	3.9×10^{12}	1.95×10^{12}	9.75×10^{11}	4.9×10^{11}	2.44×10^{11}	1.22×10^{11}	6.1×10^{10}
Inóculo	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
R	7.8×10^8	3.9×10^8	1.95×10^8	9.75×10^7	4.9×10^7	2.44×10^7	1.22×10^7	6.1×10^6

5.2.3 Determinação do potencial zeta de bactérias

Os resultados do potencial zeta da suspensão de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853) e do conjunto bactérias + nanocápsulas em suspensão estão na Figura 17. Pode-se observar que o contato das nanocápsulas (catiônicas) com as bactérias (aniônicas) leva a uma inversão do potencial zeta de $-4,18 \pm 1,6$ para $3,19 \pm 0,27$, isso pode indicar de que há uma interação eletrostática entre o micro-organismo e a NC_{CQ}, levando a um revestimento da superfície bacteriana pelas nanocápsulas (Fig. 17 B e C). A carga negativa de superfície das bactérias está associada a vários componentes, como ácidos teicóicos, teicurônicos e peptidoglicanos, nas Gram-positivas e LPS, fosfolipídios e proteínas de membrana, nas Gram-negativas, como é o caso da *P. aeruginosa*. Essa carga negativa facilita a interação com moléculas de carga positiva (Domingues *et al.*, 2014), como a NC_{CQ}.

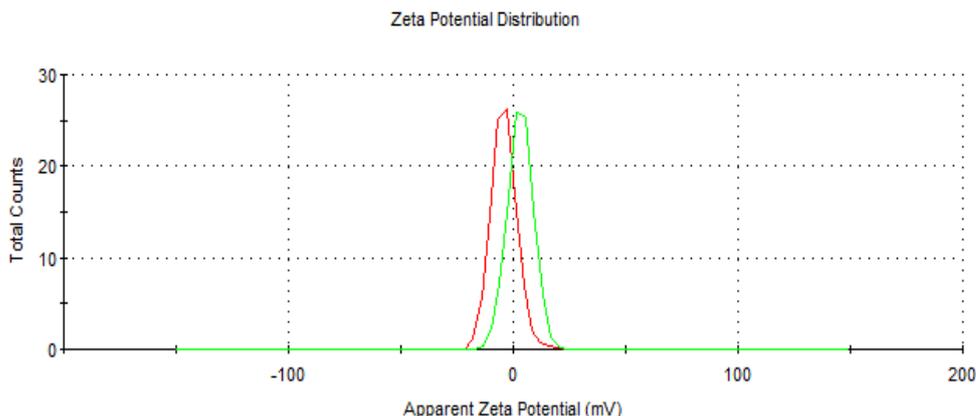


Figura 17: Gráfico de distribuição das médias do potencial zeta em mV de *P. aeruginosa* (linha vermelha), e *P. aeruginosa* + suspensão de NC_{CQ} (1:1) (linha verde). Gráfico gerado pela técnica de mobilidade eletroforética, mostrando a inversão do potencial zeta após o contato com as nanocápsulas.

5.2.4 Teste do desafio (*Challenge Test*)

O teste do desafio foi realizado em duas apresentações da NC_{CQ}, a primeira delas a suspensão propriamente dita e a segunda, esta seca após aspersão sobre o curativo de hemi-celulose. A suspensão teve os seus resultados apresentados na Tabela 7 e o curativo com NC_{CQ} na Tabela 8.

Os resultados para a suspensão de NC_{CQ} comprovam a atividade observada nos ensaios de CIM, a diluição da suspensão com tampão cloreto de sódio peptona não altera a atividade antimicrobiana, pois a concentração final do diluído fica de 90 µg/mL, acima do CIM para todas as cepas de microorganismos avaliadas (Tabela 4). Mesmo após a secagem e resuspensão, as NC_{CQ} mantêm sua atividade antimicrobiana, como pode ser visto no teste desafio realizado com o curativo (Tabela 8).

Tabela 7: Teste do desafio realizado na suspensão de NC_{CCQ}. UFC= Unidade Formadora de Colônia.

	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
Inóculo (T=0)	6,2 X 10 ⁵ UFC/g	2,4 X 10 ⁵ UFC/g	6,2 X 10 ⁴ UFC/g	4,5 X 10 ⁴ UFC/g
24 horas	-	-	-	-
7 dias	-	-	-	-
14 dias	-	-	-	-
21 dias	-	-	-	-
28 dias	-	-	-	-

Tabela 8: Teste do desafio realizado na suspensão de NC_{CCQ} aspergida sobre curativo de Hemi-celulose. UFC= Unidade Formadora de Colônia.

	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
Inóculo (T=0)	6,2 X 10 ⁵ UFC/g	2,4 X 10 ⁵ UFC/g	6,2 X 10 ⁴ UFC/g	4,5 X 10 ⁴ UFC/g
24 horas	-	-	-	2,0 X 10 ⁴ UFC/g
7 dias	-	-	-	2,0 X 10 ⁴ UFC/g
14 dias	-	-	-	8,6 X 10 ³ UFC/g
21 dias	-	-	-	-
28 dias	-	-	-	-

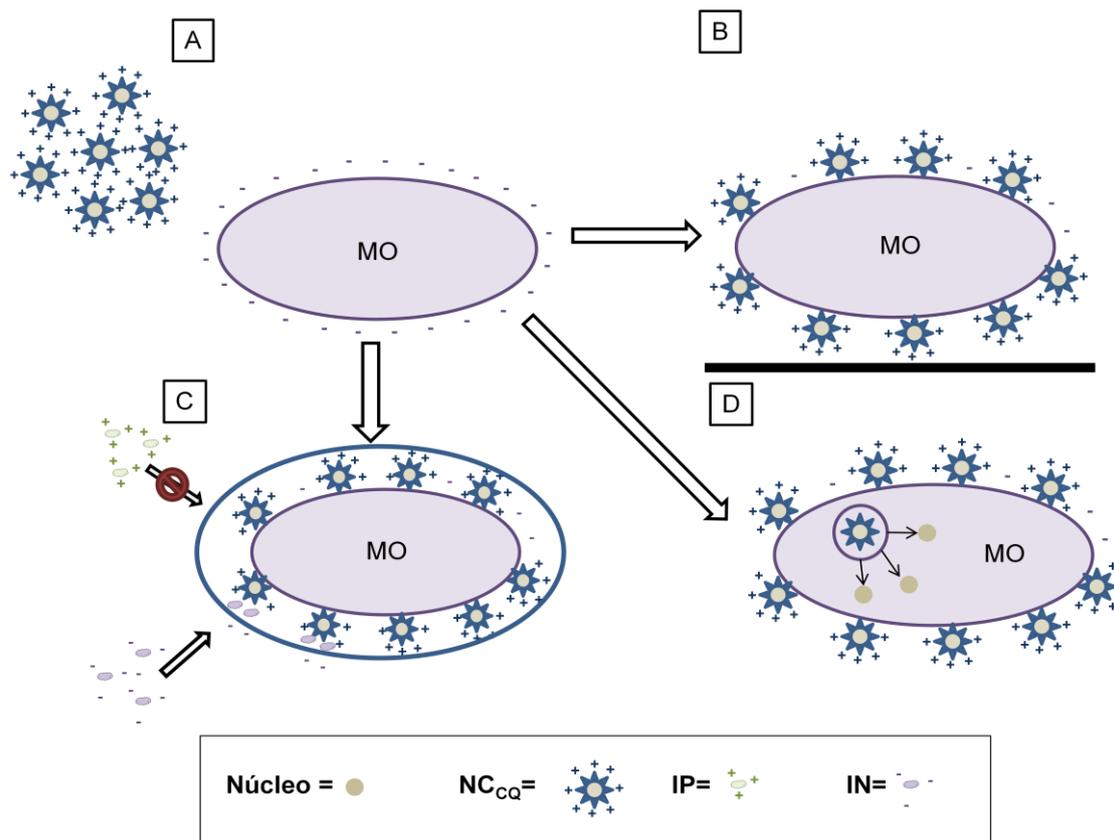


Figura 18: Hipóteses para o possível mecanismo de ação da NC_{CQ}. A: Atração das nanocápsulas catiônicas pela carga superficial negativa do micro-organismo. B: Ligação eletrostática entre a nanopartícula e o micro-organismo, as quais impedem a interação com a superfície e conseqüentemente a fixação. C: O grande número de partículas cria uma nuvem eletrônica que repele íons positivos e quela com partículas negativas. D: Possível internalização de nanocápsulas e liberação do conteúdo no interior do micro-organismo. Núcleo= α -bisabolol + triclosan; NC_{CQ}= Nanocápsula revestida; IP= Íons positivos; IN= Íons negativos.

5.3 ANÁLISES CUTÂNEAS

5.3.1 Permeação e Penetração

Os ensaios de permeação e penetração em célula de Franz automatizada mostraram que a suspensão de NC_{CQ} possui um poder de penetração limitado nas diferentes camadas da pele, sendo a permeação para o compartimento receptor completamente ausente (Fig. 19). As nanocápsulas

ficaram quase que em sua totalidade, retidas no estrato córneo, resultado adequado para uma formulação de aplicação tópica que se deseja ação local.

A retenção das NCCQ no estrato córneo, provavelmente é devida a interação com os lipídeos e proteínas presentes, que compõem aproximadamente 80% desta camada (Baroli, 2009). As pequenas concentrações de triclosan doseadas na epiderme e derme podem estar relacionadas com a rota de penetração trans-folicular, na qual o nanopartícula tem acesso à epiderme e derme através dos apêndices da pele, como glândulas sudoríparas e unidades pilossebáceas (Baroli, 2009).

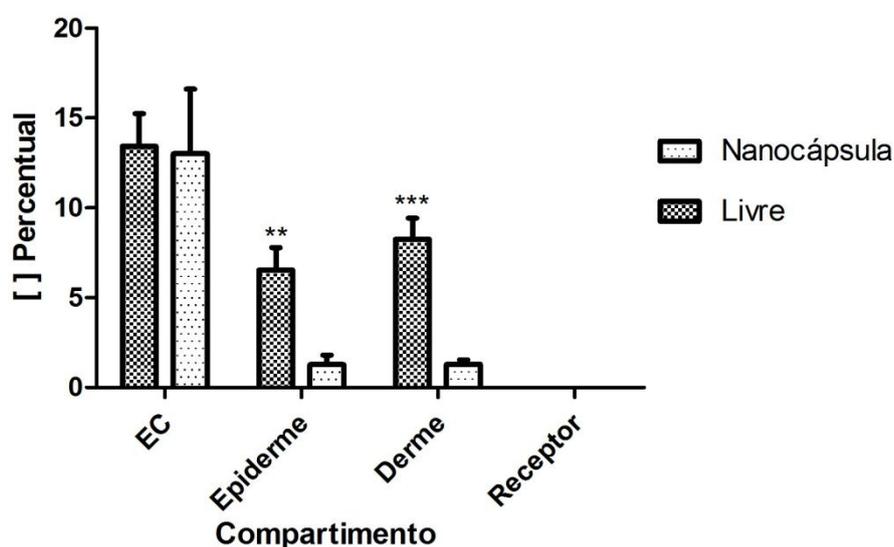


Figura 19: Perfis de penetração da suspensão de NC_{CQ} e $T\alpha_{livre}$ nas diferentes camadas da pele. **, Diferença estatisticamente significativa para $P < 0,01$ e ***, Diferença estatisticamente significativa para $P < 0.001$, na comparação entre os grupos livre e nanoencapsulado (Bonferroni).

5.3.2 Lavabilidade

Os resultados da capacidade de retenção das nanocápsulas (NC_{SQ} e NC_{CQ}) e do fármaco livre (T_{livre}) estão representados na Figura 20. É possível observar que o T_{livre} teve um perfil de retenção inferior às formulações nanoestruturadas, apresentando uma lavagem percentual total maior estatisticamente significativa (Figura 21). A nanoencapsulação é um importante fator para a retenção do fármaco na pele, isso pode ser atribuído a sua grande superfície de contato (Contri *et al.*, 2013). Quando comparadas as duas formulações nanoencapsuladas (NC_{SQ} e NC_{CQ}), não foi possível observar diferença estatisticamente significativa, mostrando que neste caso a carga de superfície por si só, não interferiu na adesão à pele.

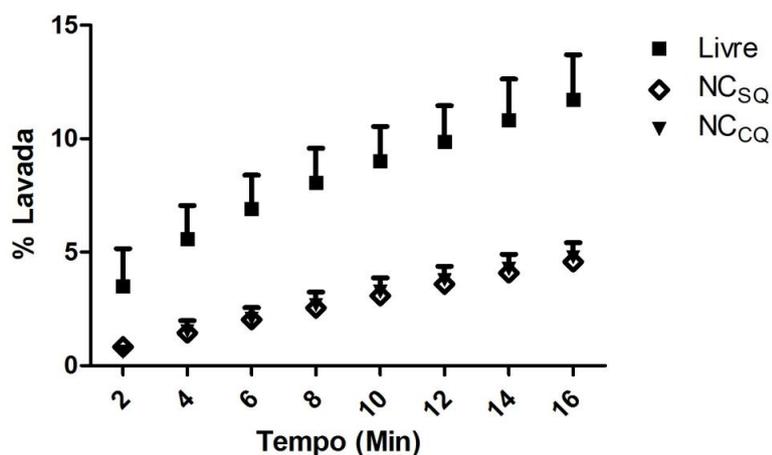


Figura 20: Perfil de lavagem do triclosan em diferentes formulações ao longo do tempo.

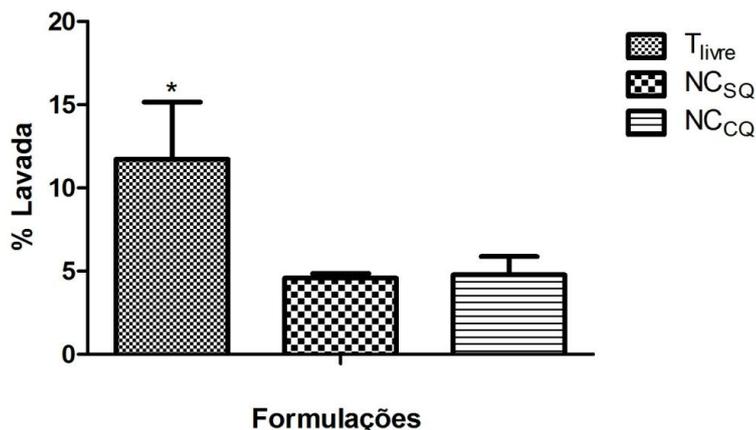


Figura 21: Massa percentual total lavada nas diferentes formulações no tempo de 16 minutos. *Diferença estatisticamente significativa para $P < 0.05$ quando todas as formulações (Bonferroni).

5.4 Incorporação das nanocápsulas ao Veloderm®

A incorporação das NC_{CQ} ao curativo de hemicelulose, através da técnica de aspersão e secagem, mostrou-se plausível. A Tabela 9 mostra a média dos resultados obtidos com a incorporação. É possível verificar que o valor de triclosan doseado ($23,41 \pm 2,54 \mu\text{g}$) fica bem abaixo do CIM obtido para *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Tabela 3), pois este valor ainda é diluído no fator de 1:9 ($2,34 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$), para a realização do experimento de teste desafio. Ainda assim, esta concentração é capaz de inibir o crescimento (Tabela 8).

Esses dados podem revelar uma limitação técnica da determinação de CIM por turbidimetria com nanocápsulas, principalmente em concentrações mais baixas. Em um primeiro momento, quando os micro-organismos entram em contato com as nanopartículas, estes não são afetados, já que o fármaco não está solúvel no meio, assim estes podem se reproduzir livremente, gerando turbidez. Quando as nanocápsulas são internalizadas ou as bactérias não conseguem se desenvolver devido à camada de nanocápsulas adsorvidas na superfície, as nanopartículas promovem a inibição do crescimento, mas a turbidez produzida inicialmente é detectada na leitura final.

Tabela 9: Valores de incorporação das NC_{CO} ao curativo de hemi-celulose. * Valor incorporado refere-se ao peso líquido da suspensão.

Incorporado (mg)	Doseamento (μg)	Teórico (μg)	Rendimento (%)
28 \pm 4,9*	23,4128 \pm 2,54	25,3055 \pm 4,5	93,2834 \pm 7,27

6 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou a obtenção de um sistema nanoestruturado, catiônico, homogêneo, sem a presença de cristais ou partículas macrométricas, com pH aceitável para administração cutânea, uma elevada densidade de partículas, capaz de controlar a liberação do triclosan e estável por pelo menos um mês. Esta formulação, mediante dois ensaios microbiológicos distintos, apresentou uma acentuada atividade antimicrobiana, com valores de CIM bem inferiores a quase todos os controles utilizados e aos registrados na literatura para as cepas testadas, incluindo *P. aeruginosa*, a qual apresenta resistência a doses elevadas de triclosan.

Com a finalidade de determinar o mecanismo de ação, da formulação em questão, foram realizados ensaios físico-químicos que revelaram o elevado número de partículas por micro-organismo nos poços de diluição e a inversão do potencial zeta de *P. aeruginosa*, quando em presença das NC_{CCQ}. Esses resultados, associados aos dados da literatura, dão uma luz sobre como as nanocápsulas da formulação (NC_{CCQ}) podem agir.

Os ensaios em pele abdominal de porcas fêmeas mostraram que não há permeação para a circulação sistêmica e a penetração nas camadas mais inferiores da pele é muito limitada, havendo uma retenção da maior parte do fármaco no local de ação. Este resultado foi corroborado pela avaliação da lavabilidade na qual as formulações nanoestruturadas tiveram uma maior adesão à pele danificada que a formulação livre.

A secagem por aspensão da suspensão de NC_{CCQ} sobre o curativo de hemicelulose mostrou-se eficaz, uma vez que se obteve um alto rendimento da incorporação (93,3%) e manutenção da atividade antimicrobiana.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a suspensão de NC_{CQ} frente a isolados clínicos resistentes a outros antibióticos e antifúngicos.
- Determinar o potencial irritante da suspensão de NC_{CQ}, assim como a mesma associada ao curativo de hemi-celulose.
- Promover modificações de superfície das nanocápsulas para uma vetorização ativa aos micro-organismos.
- Analisar o tipo de interação existente entre as nanocápsulas e os micro-organismos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mottaleb MMA, Moulari B, Beduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012; 82: 151–157.

Altoparlak U, Erol S, Akcay MN, Celebi F, Kadanali A, The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns*. 2004 30: 660–664.

Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *Journal of Controlled Release*. 2004 99: 53–62.

Alves AMH, Gonçalves JCR, Cruz AJS, Araújo DAM, Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. *Neuroscience Letters*. 2010, 472: 11–15.

American Burn Association (2013) Burn incidence and treatment in the United States: 2013 Fact Sheet Available from: http://www.ameriburn.org/resources_factsheet.php [acessado 25.01.15].

Baroli B, Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99 (1): 21–50.

Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 426: 271– 279.

Bhargava HN, Leonard PA, Triclosan: Applications and safety, *American Journal of Infection Control*, 1996, 24(3): 209-218.

Bolgiani AN, Serra MCVF. Atualização no tratamento local das queimaduras. *Rev Bras Queimaduras*. 2010; 9(2): 38-44.

Brehm-Stecher BF & Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47 (10): 3357–3360.

Chakraborty SP, Sahu SK, Mahapatra SK, Santra S, Bal M, Roy S, Pramanik P. Nanoconjugated vancomycin: new opportunities for the development of anti-VRSA agents. *Nanotechnology*, 2010, 21: 1-9.

Cho Lee AR, Leem H, Lee J, Park KC. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. *Biomaterials*. 2005. 2646: 70–76.

Chuanchuen R, Karkhoff-Schweizer RAR, Schweizer HP. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *Am J Infect Control* 2003; 31:124-127.

Chung Y, Su Y, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25 (7): 932-936.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacterial that Grow Aerobically—Sixth Edition: CLSI **Document M07-A6**. Wayne, PA, USA: CLSI; 2003.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. **CLSI Document M27-A3**. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. **CLSI Document M27-S4**. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

Contri RV, Katzer T, Ourique AF, Silva ALM, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013, 9: 1–11.

Cureo RG, Osuji G, Washington A, N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc, *Biotechnol. Lett*. 1991, 13: 441–444.

Darra E, Abdel-Azeim S, Manarac A, Shoji K, Maréchal J, Mariotto S, Cavaliere E, Perbellini L, Pizza C, Perahia D, Crimi M, Suzuki H. Insight into the

apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 476: 113–123.

Duke JA, Bogenschutz-Godwin MJ, DuCellier J, Duke P-AK. *Handbook of medicinal herbs*, 2002, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

Farrell DJ, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. Revised Reference Broth Microdilution Method for Testing Telavancin: Effect on MIC Results and Correlation with Other Testing Methodologies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58(9): 5547–5551.

Ferreira LM, Sobral CS, Blanes L, Ipolito MZ, Horibe EK. Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2010, 63: 865-869.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J, Ammouy N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, 55: 1-4.

Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2009, 5: 254-263.

Giannola LI, Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Cordone L. Ocular gelling microspheres: *in vitro* precorneal retention time and drug permeation through reconstituted corneal epithelium. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 2008, 24(2): 186-196.

Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns*, 2015, 41: 153–162.

Hazen KC. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing *in vitro*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013, 75: 60–63.

Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 2011, 156: 128–145.

Ministério da Saúde do Brasil. Informe Saúde. Ano VI, nº 152; 2002.

Jahn B, Martin E, Stueben A, & Bhakdi S. Susceptibility Testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2HTetrazolium Bromide Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(3): 661–667.

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*. 2000, 28(2) 184-196.

Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *Microbiology Letters*. 2008, 279: 71–76.

Kamatou GPP, Viljoen AM. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, 87:1–7.

Koburger T, Hübner N-O, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP–iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 65: 1712–1719

Kothamasu P, Kanumur H, Ravur N, Maddu C, Parasuramrajam R, Thangavel S. Nanocapsules: The Weapons for Novel Drug Delivery Systems. *BioImpacts*. 2012, 2(2): 71-81.

Kumar A, Schweizer HP, Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57: 1486–1513.

Lboutounne H, Chaul JF, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*. 2002, 82: 319–334.

Liu J, Li Y, Rong X, Lin W, Zhang T, Wang B, Li XB, Jiang S, Zhang Q. Application of Crystalline Cellulose Membrane (Veloderm®) on Split-Thickness Skin Graft Donor Sites in Burn or Reconstructive Plastic Surgery Patients. *Journal of Burn Care & Research*. 2013, 34(3): 176-182.

Luterman A, Dacso CC, Curreri PW. Infections in burn patients. *The American Journal of Medicine* 1986; 81: (supplA): 45-52.

Maillard JY, Messager S, Veillon R. Antimicrobial efficacy of biocides tested on skin using an ex-vivo test. *Journal of Hospital Infection*. 1998, 40: 313-323.

Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*. 2008. 72: 43–51.

Mazzarino L, Travelet C, Ortega-Murillo S, Otsuka I, Pignot-Paintrand I, Lemos-Senna E, Borsali R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, 370: 58–66.

McMurry LM, Oethinger M, Levy SB, Triclosan targets lipid synthesis, *Nature*. 1998, 394: 531-532.

Melandri D, De Angelis A, Orioli R, Ponzielli G, Lualdi P, Giarratana N, Reiner V. Use of a new hemicellulose dressing (Veloderm®) for the treatment of split-thickness skin graft donor sites A within-patient controlled study. *Burns*. 2006; 32, 964–972.

Meletiadis J, Meis JFGM, Mouton JW, Donnelly JP, Verweij PE. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(8), 2949–2954.

Messager S, Goddard PA, Maillard JY. Determination of the antibacterial efficacy of several antiseptics tested on skin by an 'ex-vivo' test. *J. Med. Microbiol*. 2001, 50: 284–292.

Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M & Schweizer HP. Identification and Characterization of TriABC-OpmH, a Triclosan Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requiring Two Membrane Fusion Proteins. *Journal of Bacteriology*, 2007: 7600–7609.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium

forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Neumann G, Cornelissen S, van Breukelen F, Hunger S, Lippold H, Loffhagen N, Wick LY, Heipieper HJ. Energetics and surface properties of *Pseudomonas putida* DOT-T1E in a two-phase fermentation system with 1-decanol as second phase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4232–4238.

Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA, Herndon, DN. Current treatment of severely burned patients. *Annals of Surgery*. 1996; 223(1):14-25.

Oliveira CP, Venturini CG, Donida B, Poletto FS, Guterres SS, Pohlmann AR. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, 2013, 9: 1141-1150.

Pippi B, Lana AJD, Moraes RC, Güez CM, Machado M, Oliveira LFS, Lino von Poser G, Fuentefria AM. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118, 839--850

Pujana MA, Pérez-Álvarez L, Iturbe LCC, Katime I. “Water dispersible pH-responsive chitosan nanogels modified with biocompatible crosslinking-agents” *Polymer*. 2012, 53: 3107-3116.

Pillai, CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009, 34(7): 641–678.

Poletto FS, Jäger E, Cruz L, Pohlmann AR, Guterres SS. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, 2008, 28: 472–478.

Pruitt Jr BA. The diagnosis and treatment of infection in the burn patient. *Burns*. 1984, 11: 79-91.

Pruitt Jr BA, McManus AT. Opportunistic infections in severely burned patients. *The American Journal of Medicine*. 1984, 76: 146-154.

Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Res*. 2004, 339: 2693–2700.

Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003, 4(6): 1457–1465.

Rennie RP, Koeth L, Jones RN, Fritsche TR, Knapp CC, Killian SB, Goldstein BP. Factors influencing broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for dalbavancin, a new glycopeptide agent. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45: 3151–3154.

Ricci EB, Cassino R, Di Campli C. Microcrystalline cellulose membrane for re-epithelisation of chronic leg wounds: a prospective open study. *International Wound Journal*. 2010; 7: 438–447.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, 31(7): 603–632.

Ryssel H, Kloeters O, Germann G, Schäfer Th, Wiedemann G, Oehlbauer M. The antimicrobial effect of acetic acid—An alternative to common local antiseptics? *Burns*. 2009, 35: 695–700.

Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012, 74: 412–414

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on triclosan (antimicrobial resistance), 2010.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 2003, 26, (5): 726-737.

Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A, *Biomacromolecules*. 2003, 4(3): 641-648.

Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 7: 2767–2781.

Shamim S & Rehman A. Physicochemical surface properties of *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2 under cadmium stress. *J. Basic Microbiol.* 2014, 54: 306–314.

Simon-Deckers A, Loo S, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Menguy N, Reynaud C, Gouget B, Carriere M, Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2009; 43(21): 8423–8429.

Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *JPP.* 2001, 53: 1047–1067.

Suphya PMS; Rankita MMS; Sanjeeb KS. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2012, 8 : 147–166.

Terroso, T. Co-encapsulação de Indometacina/ester de indometacina e Alfabisabolol em nanocápsulas poliméricas: efeito citotóxico e seletivo em células de glioma. Dissertação de mestrado. UFRGS, 2010.

Terroso, T. Desenvolvimento de Nanopartículas contendo α -Bisabolol e avaliação das suas potenciais atividades citotóxica e gastroprotetora. Tese de Doutorado. UFRGS, 2014.

Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Imura T, Inoue G, Nakazawa T, Takahira N, Uchida K, Fukahori N, Shimomura K, Takaso M. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials.* 1999, 20(15): 1407–1414.

Venturini CG, Jarger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR, Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2011, 375: 200–208.

Villegas LF, Marçalo A, Martin J, et al. (+)-epi- α -bisabolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. *J Nat Prod.* 2001, 64: 1357–1359.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

9.1.1 Validação do método analítico para doseamento de triclosan por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE:

Os parâmetros avaliados para a validação do método de doseamento do triclosan foram os seguintes: especificidade (frente uma formulação de nanocápsulas sem fármaco), linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação. Para o α -bisabolol, foi utilizada técnica já validada (Terroso, 2010), sendo construídas três curvas, para verificar a linearidade e obter a equação da reta. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20A (Tokyo, Japão), como detector de UV/VIS acoplado. Os parâmetros utilizados no aparelho estão representados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos utilizados em metodologia analítica para quantificação de triclosan e α -bisabolol.

Parâmetro	Valores
Detecção (Triclosan)	UV ($\lambda=280$ nm)
Detecção (α -Bisabolol)	UV ($\lambda=207$ nm)
Fluxo	1 mL/min
Coluna	C-18 (150 mm, 4.9 mm, 4 μ m)
Fase Móvel	Acetonitrila:Água (60:40) pH \approx 4,5 (Corrigido com Ácido Acético)
Volume de Injeção	Triclosan (30 μ L) e α -Bisabolol (20 μ L)
Tempo de Retenção	\approx 4,2 minutos

6.1.1.1 Especificidade:

A especificidade foi analisada através da leitura de uma solução de fármaco, uma suspensão de nanocápsula com o fármaco presente e uma suspensão sem a presença do mesmo, apenas os excipientes. Os mesmos parâmetros cromatográficos foram adotados para as análises das amostras, mas nenhum pico foi observado na ausência dos fármacos Figura 22 A, concluindo-se que a metodologia era específica.

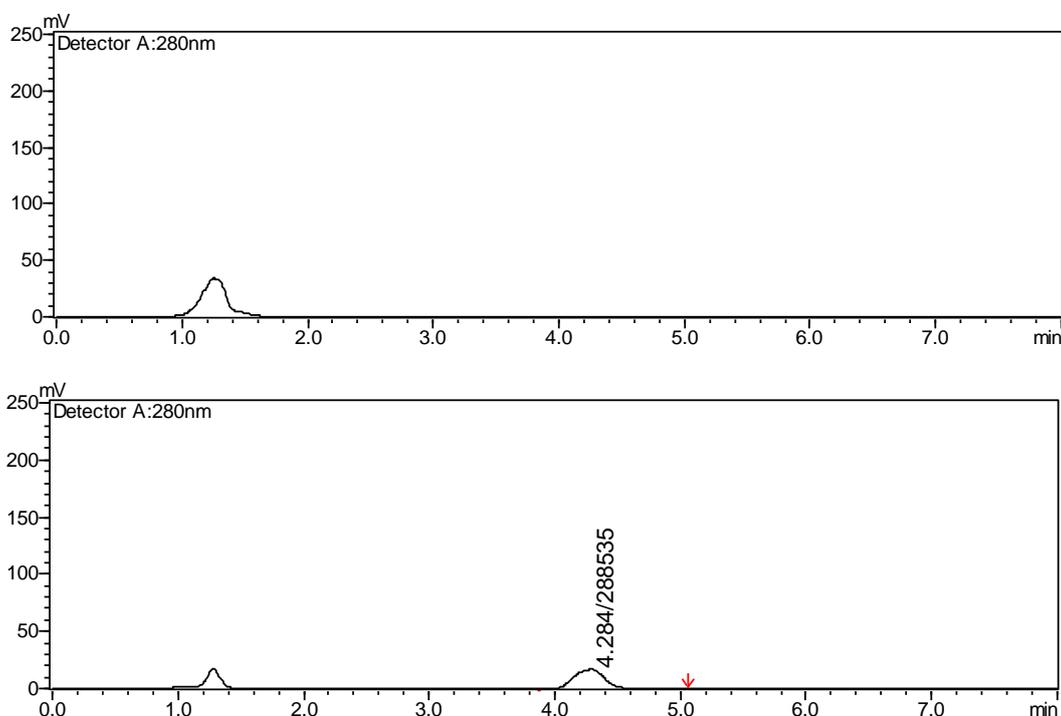


Figura 22: A) Leitura de ensaio de especificidade, ausência de pico no tempo de retenção do Triclosan (4,2 minutos). B) Mostrando o pico em 4,2 minutos, referente ao triclosan presente em uma suspensão NC_{CQ}, não observado na figura A, mostrando que o método é específico.

9.1.1.2 Linearidade:

Para a verificação da linearidade do método, foram feitas três curvas analíticas, com concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, para o triclosan e 5,

10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$ para o α -bisabolol, foi utilizado como meio de dissolução acetonitrila pura. As amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μm (Millipore[®] Millex-HV) e posteriormente analisadas em CLAE. A Figura 23 representa a média das três curvas analíticas realizadas para o triclosan em acetonitrila e a Figura 24 a média das três curvas em etanol:água (1:1).

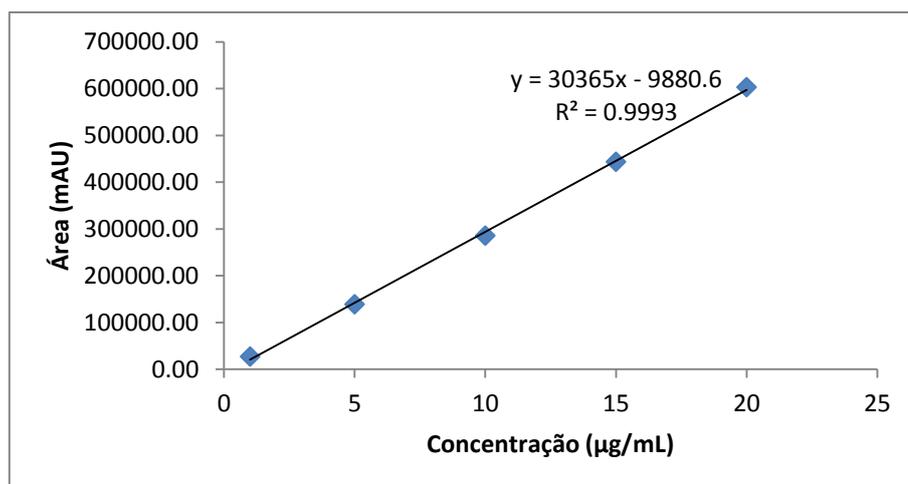


Figura 23: Média das três curvas analíticas de triclosan em acetonitrila.

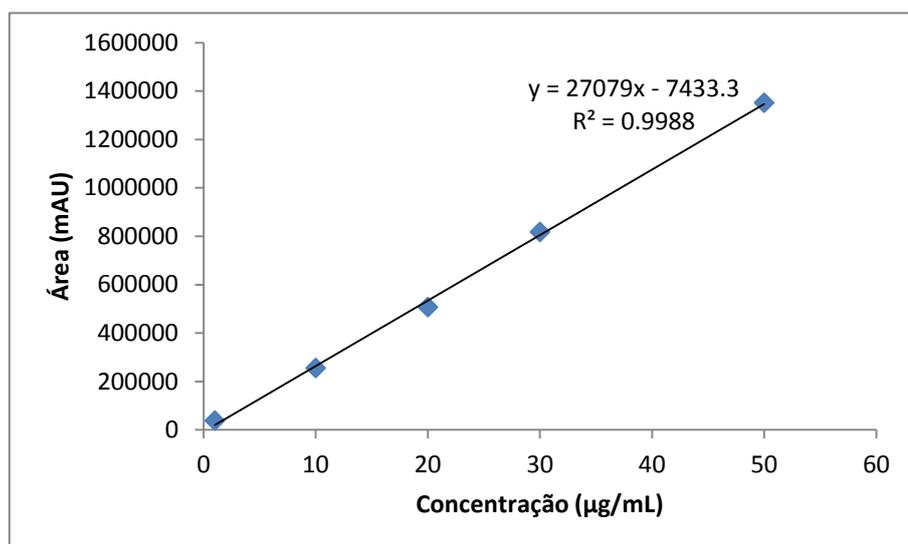


Figura 24: Média das três curvas analíticas de triclosan em etanol:água (1:1).

9.1.1.3 Repetibilidade:

Para avaliação da repetibilidade, seis amostras de suspensões de nanocápsulas foram preparadas para uma concentração de 1 µg/mL de triclosan. As amostras da suspensão foram dissolvidas em acetonitrila e levadas ao ultrassom por 30 minutos para promover uma total extração do fármaco, após isso, foram diluídas a concentração adequada, filtradas em filtro 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) e analisadas em CLAE. O resultado apresentou um desvio padrão relativo (DPR) de 1,15% para a sextuplicata, o que se enquadra no exigido pela *International Conference on Harmonization* (ICH) em 2005 e a RE 899 da Anvisa.

9.1.1.4 Precisão Intermediária:

A precisão intermediária foi conseguida através da comparação do DPR dos resultados das análises em sextuplicata, realizadas em dois dias consecutivos, ambas na concentração de 1 µg/mL de triclosan. O resultado do DPR foi de 4,69%, dentro do exigido pela ICH e Anvisa.

9.1.1.5 Exatidão:

Para a análise de exatidão, foi adicionada uma quantidade conhecida de triclosan, a partir de uma solução stock, e uma suspensão de nanocápsulas branca dissolvida em acetonitrila. As concentrações utilizadas na análise foram de 5, 10 e 15 µg/mL, e os resultados mostraram uma recuperação de 98,1±0,4%, 97,4±0,9% e 99,6±0,2% respectivamente, todos de acordo com a ICH e Anvisa.

9.1.1.6 Limite de Quantificação e Detecção:

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram obtidos através de cálculos matemáticos utilizando as equações 6 e 7, as quais dão a relação entre o desvio padrão (DP) das curvas analíticas e seus coeficientes angulares (A), usando os fatores multiplicadores sugeridos pela ICH. Os valores obtidos para o limite de quantificação e de detecção foram de 0,12 e 0,04 µg/mL, respectivamente.

Equação 6

$$LQ = \frac{10 \times DP}{A}$$

Equação 7

$$LD = \frac{3 \times DP}{A}$$

9.2 ANEXO 2:

9.2.1 Validação do método de extração do triclosan em curativo de hemi-celulose e pele abdominal de porcas fêmeas:

Os ensaios de recuperação foram realizados através da contaminação da matriz a ser extraída (curativo ou pele suína), com uma quantidade conhecida do fármaco em solução. Esta foi deixada em contato por uma hora, após o qual foi promovida a extração utilizando acetonitrila pura, seguida de dois minutos no vortex e 30 minutos no ultrassom. O ensaio foi realizado em dois dias separados e os resultados, mostrados na Tabela 11, expressos em DPR. O método é considerado preciso se estiver dentro dos 5% exigidos pela ICH e Anvisa.

Tabela 71: Desvio Padrão Relativo intra-dia e inter-dia das análises de precisão intermediária da recuperação.

Amostra	Dia 1	Dia 2	Inter-dia
Curativo	4.305651	2.896896	3.504042
Pele	3.101481	2.140234	3.292883

9.3 ANEXO 3

9.3.1 Valores de absorvância por turbidimetria

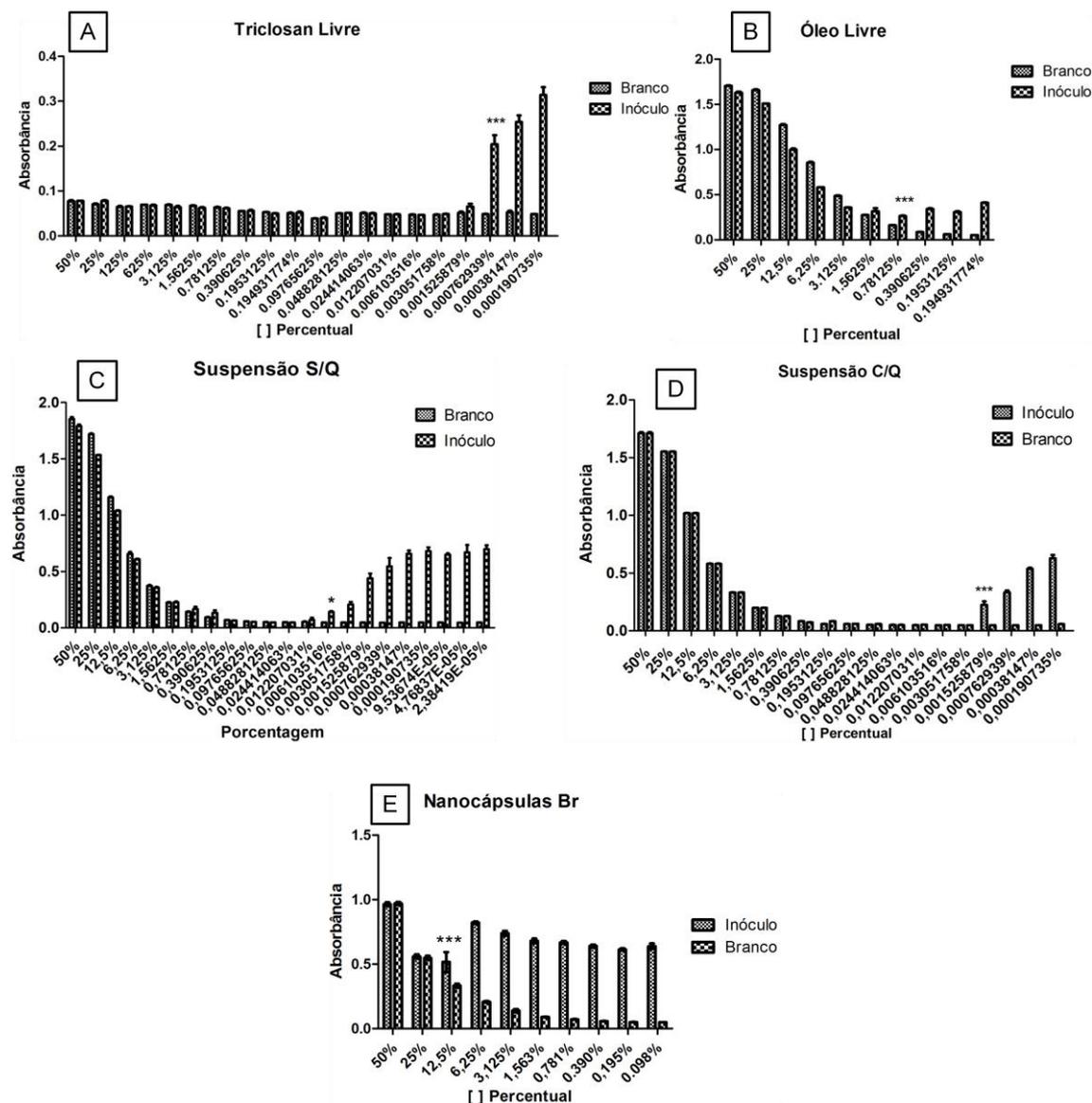
9.3.1.1 *Escherichia coli*

Figura 25: Valores de absorvância ($\lambda=625$ nm) para todas as formulações testadas contra *E. coli*. A= T_{livre} ; B= α_{livre} ; C= NC_{SQ} ; D= NC_{CQ} E= NC_{BR} . * Diferença significativa estatisticamente para $P<0.05$ quando comparado absorvância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença significativa estatisticamente para $P<0.001$ na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni).

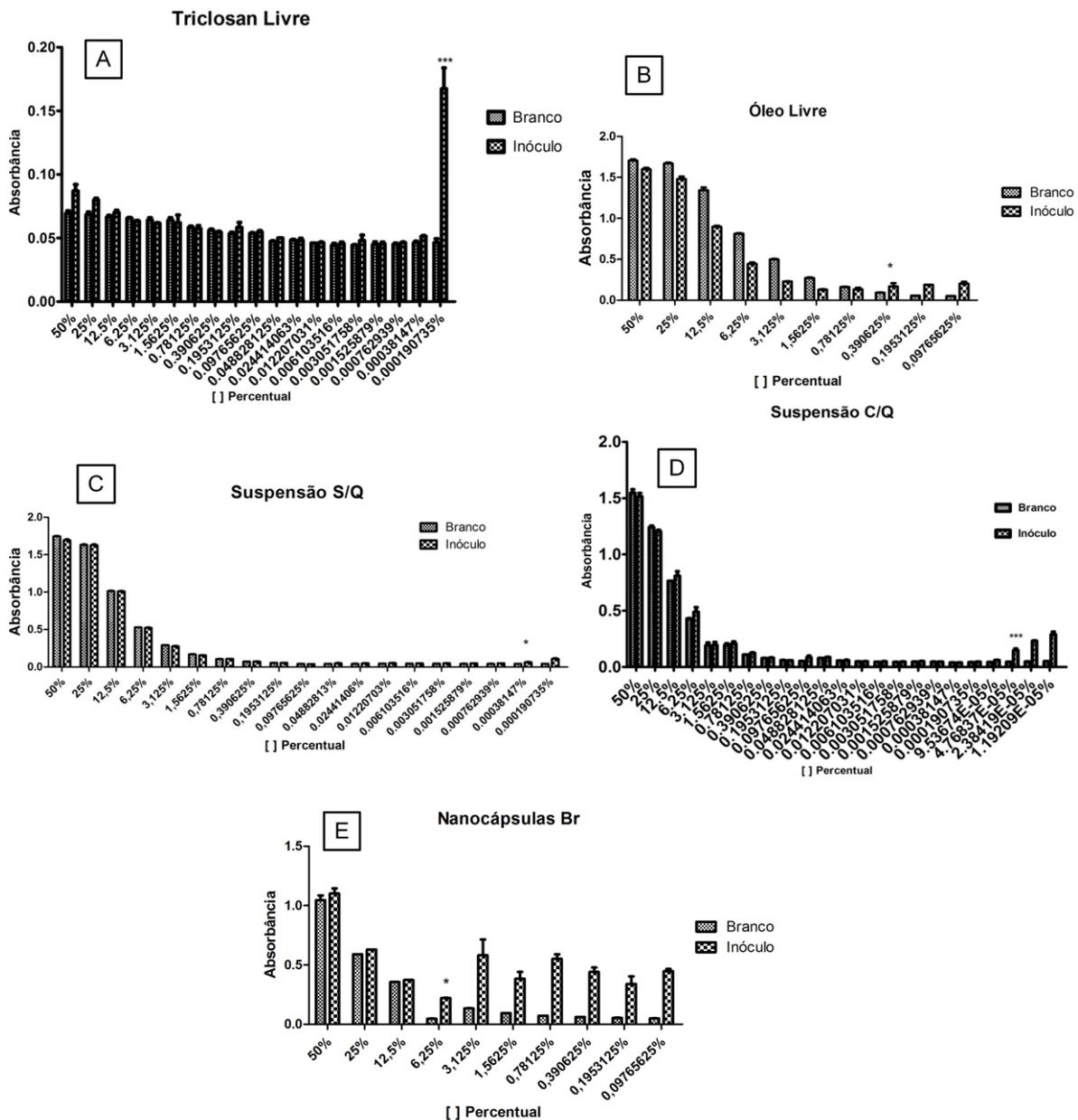
9.3.1.2. *Staphylococcus aureus*

Figura 26: Valores de absorção ($\lambda=625$ nm) para todas as formulações testadas contra *S. aureus*. A= T_{livre}; B= α _{livre}; C= NC_{SQ}; D= NC_{CQ}; E= NC_{BR}. * Diferença significativa estatisticamente para $P<0.05$ quando comparado absorvância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença significativa estatisticamente para $P<0.001$ na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni).

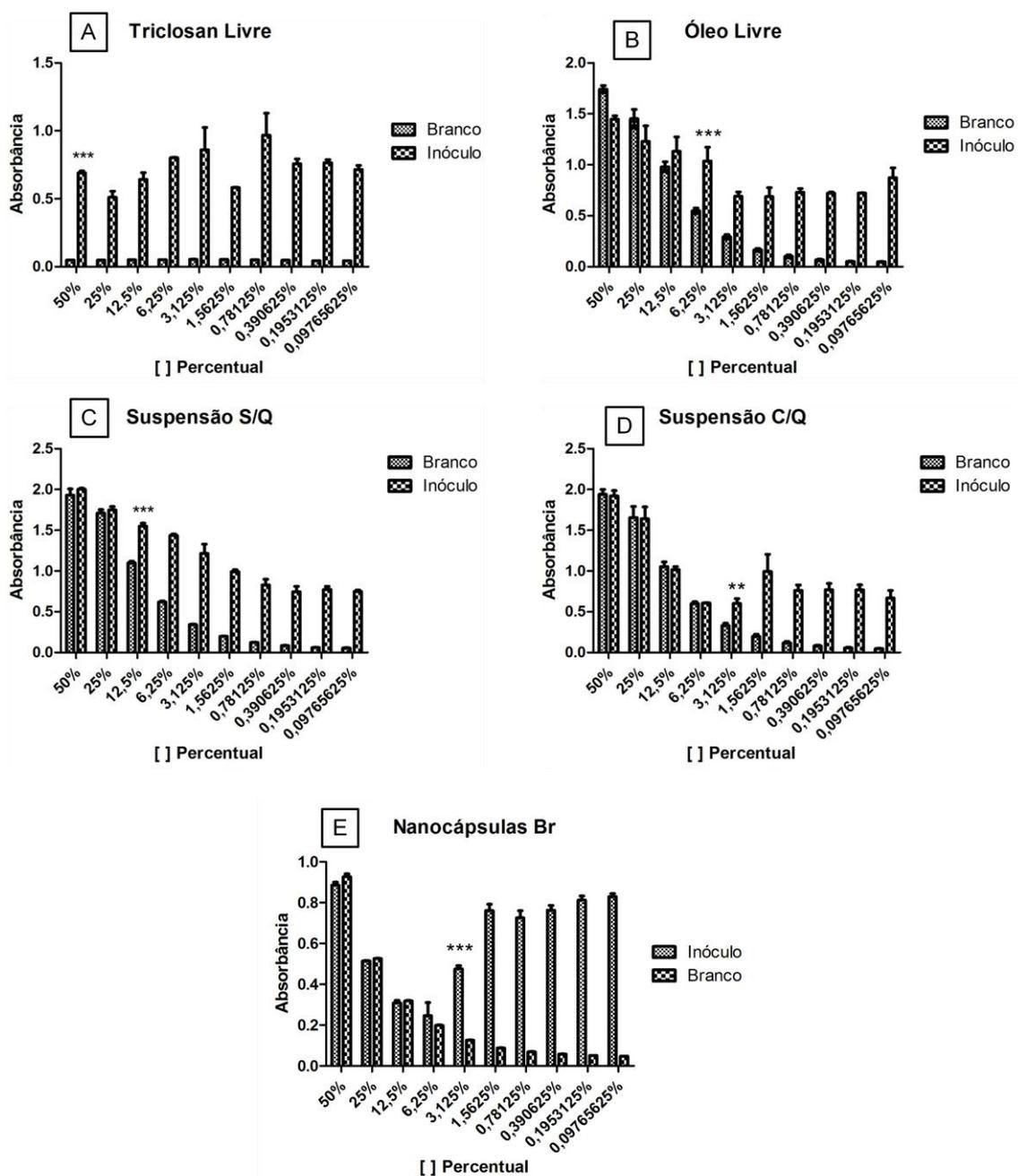
9.3.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Figura 27: Valores de absorção ($\lambda=625$ nm) para todas as formulações testadas contra *P. aeruginosa*. A= T_{livre}; B= α _{livre}; C= NC_{SQ}; D= NC_{CQ}, E= NC_{BR}. * Diferença significativa estatisticamente para P<0.05 quando comparado absorbância do branco e do inóculo (Bonferroni), *** Diferença estatisticamente significativa para P<0.001 na comparação entre branco e inóculo (Bonferroni).

Figura K

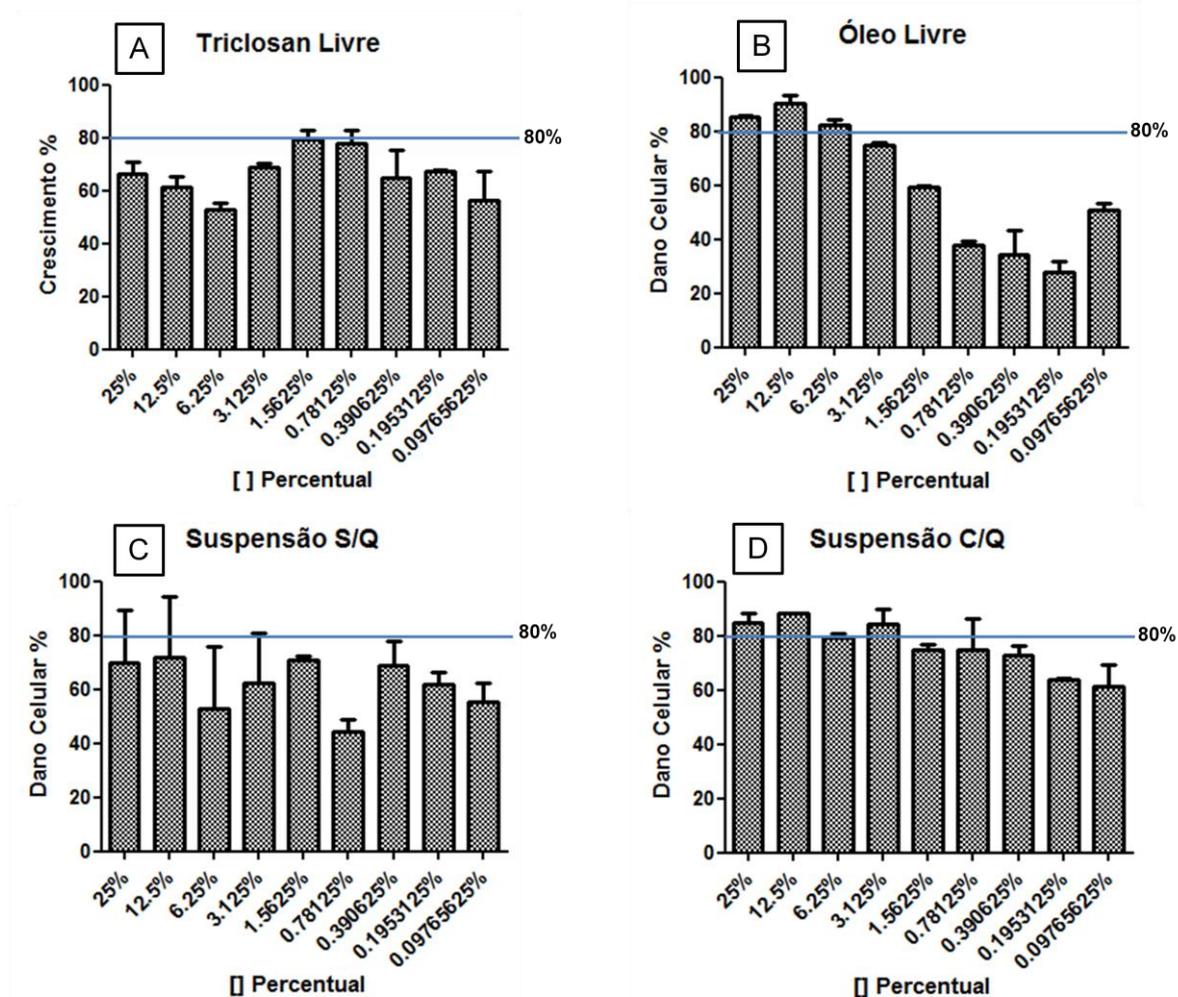
9.3.1.4 *Candida albicans*

Figura 28: Valores de absorção ($\lambda=570-690$ nm) para todas as formulações testadas contra *C. albicans*. A= Tlivre; B= olivre; C= NCSQ; D= NCCQ. Os valores de CIM foram as últimas concentrações maiores que 80% de dano celular em relação ao controle positivo.

9.4 ANEXO 4

9.4.1 Laudo de análise do teste desafio (*Challenge Test*)



RE - 6129/14

Porto Alegre, 04 de agosto de 2014.

RELATÓRIO DE ENSAIO

1. OBJETIVOS

Realizar o teste de Eficácia do Sistema Conservante (*Challenge Test*) frente a 05 micro-organismos, representantes de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungo filamentosos e levedura.

2. MATERIAL ANALISADO

Material encaminhado pela DRA. SILVIA GUTERRES/ CNPQ- PROCESSO 550423/ 2012/5, solicitante SR. JOÃO GUILHERME BARRETO DE MARCHI. Endereço correspondente Av. Ipiranga 2752, bairro Santana- Porto Alegre/RS.

Registro 6129: Amostra de anti-séptico líquido.

Registro 6130: Amostra de curativo contendo anti-séptico.

Material recebido dia 20.06.2014

3. PROCEDIMENTOS

Foram preparadas suspensões de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Candida albicans* ATCC 10231 na concentração de $\approx 1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Com auxílio de uma pipeta esterilizada, foram transferidos 100 μ L das suspensões em frascos contendo amostra. Após 24h, 7, 14, 21 e 28 dias de contato em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, a amostra foi transferida para placas individuais com meio de cultura específico para cada micro-organismo testado. As placas de bactérias foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 1$ por 2 dias e as de fungos a $25-30^\circ\text{C}$ por 5 dias. Após este período foi realizada a quantificação.

Meios de cultura utilizados:

Ágar MacConkey = cultivo de *Escherichia coli*;

Ágar Baird Parker = cultivo de *Staphylococcus aureus*;

Ágar Cetrimide = cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*;

Ágar Batata Glicosado = cultivo de *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Página 1 de 3 do R.E.: 6129/2014.

4. RESULTADOS

4.1 Amostra 6129: Amostra de anti-séptico líquido.

Micro-organismos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
Quantificação tempo = zero	6,2 X 10 ⁵ UFC/g	2,4 X 10 ⁵ UFC/g	3,6 X 10 ⁴ UFC/g	3,7 X 10 ⁴ UFC/g	4,5 X 10 ⁴ UFC/g
Quantificação após contato de 24h com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento
Quantificação após contato de 7 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento
Quantificação após contato de 14 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento
Quantificação após contato de 21 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento
Quantificação após contato de 28 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento

UFC = unidade formadora de colônia

4.2 Amostra 6130: Amostra de curativo contendo anti-séptico.

Micro-organismos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
Quantificação tempo = zero	6,2 X 10 ⁵ UFC/g	2,4 X 10 ⁵ UFC/g	3,6 X 10 ⁴ UFC/g	3,7 X 10 ⁴ UFC/g	4,5 X 10 ⁴ UFC/g
Quantificação após contato de 24h com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	3,4 X 10 ³ UFC/g	2,0 X 10 ⁴ UFC/g
Quantificação após contato de 7 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	7,0 X 10 ³ UFC/g	2,0 X 10 ⁴ UFC/g
Quantificação após contato de 14 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	6,5 X 10 ³ UFC/g	8,6 X 10 ³ UFC/g
Quantificação após contato de 21 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	3,1 X 10 ³ UFC/g	ausência de crescimento
Quantificação após contato de 28 dias com o produto	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	2,9 X 10 ³ UFC/g	ausência de crescimento

UFC = unidade formadora de colônia

Página 2 de 3 do R.E.: 6129/2014.



5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram que o produto *6129 - anti-séptico líquido* possui sistema conservante eficaz.

Os resultados obtidos para o produto *6130 - curativo contendo anti-séptico* indicaram ineficácia do sistema conservante para os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.



CRISTIANE P. MAURER
CRF nº 12297
MICROBIOLOGISTA

Os resultados acima se referem somente à amostra ensaiada.
Este laudo só pode ser reproduzido na sua íntegra. A reprodução parcial somente com autorização do emitente.

Página 3 de 3 do R.E.: 6129/2014.