

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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana para potenciais aplicações farmacêuticas

RODRIGO CÉ

Porto Alegre, 2016



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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana para potenciais aplicações farmacêuticas

Dissertação apresentada por **Rodrigo Cé** para  
obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da universidade federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 07 de Março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Andréia Buffon  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Cé, Rodrigo  
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana para potenciais aplicações farmacêuticas / Rodrigo Cé. -- 2016.  
122 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. Quitosana. 3. Antimicrobiano. I. Pohlmann, Adriana Raffin , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório K204 do Instituto de Química e nos Laboratórios 405, 103 e 304A da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com financiamentos da CAPES, CNPq e FAPERGS.



A minha mãe **Marlene de Fatima Fernandes da Costa Cé** e aos demais familiares.





## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Adriana Raffin Pohlmann pela oportunidade cedida, pela orientação proporcionada nestes 24 meses de mestrado, pela confiança e estímulo que foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Aos professores Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres, Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria e Dr. Vladimir Lavayen pelas importantes colaborações obtidas no âmbito do mestrado, os quais transmitiram seus conhecimentos afim de proporcionar um trabalho relevante para área estudada.

Aos colegas colaboradores João Guilherme de March, Vanessa Zafaneli Bergamo e Denise Jornada por ter contribuído em parte no trabalho desenvolvido.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade concedida.

A CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro disponibilizado para realizar este trabalho.

Aos colegas e amigos dos laboratórios K204 do Instituto de Química, 405 e 304A da Faculdade de Farmácia, pelas contribuições que foram fundamentais para o presente desenvolvimento tecnológico deste trabalho.

À Martiele Cortes Borges pelo apoio e companheirismo tidos neste período de fundamental importância.

À minha Mãe Marlene de Fatima Fernandes da Costa Cé que me apoiou e me deu todo o suporte necessário.

E por fim, agradeço a minha família que me apoio, me compreendeu e me iluminou para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.



## RESUMO

Agentes com propriedades antimicrobianas e antifúngicas são nanoencapsuladas em nanopartículas tendo em vista aumentar os efeitos contra as infecções microbiológicas causadas por *Aspergillus ssp.* e *Staphylococcus aureus*. Dentre os sistemas veiculares para entrega de fármacos as nanocápsulas de núcleo lipídico se destacam e tem sido largamente estudadas devido aos seus potenciais terapêuticos. Neste estudo desenvolvemos e caracterizamos as nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana para assim associar efeitos antimicrobianos, do fármaco e de material de revestimento das nanocápsulas. Para tanto, encapsulamos a dapsona nas nanocápsulas com o propósito obter sua dupla atividade antimicrobiana, associada à da quitosana, material de revestimento. Posteriormente, as nanocápsulas contendo dapsona e revestidas com quitosana foram secas pela técnica de *spray-drying* a fim de desenvolver uma plataforma tecnológica para a obtenção de produtos intermediários e finais, para futuras aplicações pulmonares ou tópicas dos pós de nanocápsulas. As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico e as com dapsona revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 e fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana apresentaram distribuição unimodal. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar a coroa hidrofílica das nanocápsulas constituída de estruturas micelas. Os resultados demonstraram uma redução de até dez vezes na concentração de dapsona quando nanoencapsulada em sistema nanoestruturado revestidos com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana em comparação com a administração da dapsona em solução para efeitos antibacterianos. As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico sem o fármaco revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana também inibiram o crescimento bacteriano e fúngicos quando a quitosana foi administrada nas concentrações relativas. O efeito da quitosana demonstrou elevado potencial para inibir o crescimento bacteriano e fúngico. Os pós das nanocápsulas contendo dapsona revestidas com quitosana e secas com leucina apresentaram produtos intermediários para futuras aplicações biológicas, tanto para via respiratória quanto para via tópica a fim coibir as infecções causadas pelos microorganismos.

Palavras chaves: Nanocápsulas de núcleo lipídico; quitosana, antimicrobiano.



## ABSTRACT

Agents with antimicrobial and antifungal properties were encapsulated into nanoparticles in order to improve the effects against microbial infections caused by *Aspergillus spp.* and *Staphylococcus aureus*. Among the carriers for drug delivery systems of the lipid core nanocapsules have been widely studied because of their therapeutic potential. In this study we have developed and characterized the lipid core nanocapsules coated with chitosan thus to associate antimicrobial effects of the drug to nanocapsules of the coating material. To this end, dapsona was encapsulated into the nanocapsules in order to obtain a double antimicrobial activity, associated to the chitosan coating material. Subsequently, the nanocapsules containing dapsona and coated with chitosan were dried by spray-drying technique in order to develop a technological platform to obtain intermediates and final products for future pulmonary or topical application of nanocapsules powders. The lipid core nanocapsules with and without dapsona coat with phosphatidylcholine and phosphatidyl choline and polysorbate 80, polysorbate 80, and chitosan showed unimodal distribution. By transmission electron microscopy it was possible to observe the crown of hydrophilic nanocapsules consisting of micellar structures. The results showed a reduction of up to ten times the concentration of dapsona when nanocoated in nanostructured system coated with phosphatidylcholine, polysorbate 80 and chitosan compared to administration of dapsona in solution for antibacterial effects. The lipid core nanocapsule formulations without drug coated with phosphatidylcholine, polysorbate 80, chitosan also inhibit bacterial and fungal growth when chitosan was administered in relative concentrations. The effect of chitosan demonstrated high potential to inhibit bacterial and fungal growth. The powder of nanocapsules containing dapsona coated with chitosan and dried with leucine showed intermediate products for future biological applications, for both the airway and topically to prevent infections caused by microorganisms.

Keywords: Lipid-core nanocapsules; chitosan; antimicrobial.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Esquema 1: Estrutura química da dapsona.....	34
Esquema 1: Estrutura química da quitosana.....	38

### MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3: Esquema ilustrativo do método de preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico (deposição interfacial de polímero pré-formado).....	49
--	----

### RESULTADOS

Figura 4: Curva de distribuição de diâmetros determinada por difração de laser.....	63
Figura 5: Curva de distribuição de diâmetros determinada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS).....	63
Figura 6: Gráfico de radar plotado a partir dos dados de difração de laser das amostras LNC, LNC-CS, DAP-LNC e DAP-LNC-CS.....	64
Figura 7: Microanálise química elementar.....	65
Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	66
Figura 9. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e b) ampliação da imagem da coroa hidrofílica das LNC.....	67
Figura 10. a) Distribuição de diâmetros das estruturas micelares da coroa hidrofílica das LNC; b) Ampliação da imagem de microscopia eletrônica das estruturas micelares e c) Modelo das estruturas micelares.....	68
Figura 11. Ampliações de imagens de microscopia eletrônica mostrando a sequência de transformação de micelas esféricas em cilíndricas.....	68
Figura 12. Histogramas de frequência de diâmetros do centro das estruturas micelares.....	69
Figura 13. Modelo representativo das nanocápsulas de núcleo lipídico, destacando a coroa hidrofílica constituída de estruturas micelares.....	69

## DESENVOLVIMENTO DE NANOCAPSULAS DE NUCLEO LIPIDICO NA FORMA DE PÓS

Figura 14: Gráfico de desaglomeração dos pós por diâmetro médio $D_{[4,3]}$ por volume em $\mu\text{m}$ .....	76
Figura 15: Gráfico da área superficial específica em $\text{m}^2/\text{g}$ .....	76
Figura 16: Gráficos de radar plotado a partir dos dados de difração de laser das amostras DAP-LNC-CS secas com 1% (a) e 2% (b) de leucina e 3% (c), 5% (d) e (e) 10% de lactose.....	77
Figura 17: Gráfico das análises estatísticas da desaglomeração dos pós de 5 a 30 minutos analisados por $D_{[4,3]}$ em nm.....	78
Figura: 18 . Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações secas com leucina.....	80



## LISTA DE TABELAS

### MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1: Composição quali-quantitativa das formulações em miligramas para 10 mL de formulação final (g/mL).....	49
--	----

### RESULTADOS

Tabela 2: Diâmetro médio volumétrico $D[4,3]$ , diâmetro médio hidrodinâmico, calculado pelo método de Cumulants ( $d_{z-ave}$ ) e pelo algoritmo de CONTIN ( $d_h$ ), largura a meia altura da curva de distribuição de diâmetros (FWHM), calculada pelo algoritmo de CONTIN e índice de polidispersão (PDI) das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.....	62
Tabela 3: Teor de dapsona na formulação, eficiência de encapsulação (EE), potencial zeta e pH das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.....	62

### ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Tabela 4: Perfil das concentrações inibitórias mínimas para bactérias.....	71
Tabela 5: Área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por ml de poço (AIM).....	71

### ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Tabela 6: Perfil das concentrações inibitórias mínimas para fungos.....	73
Tabela 7: Área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por ml de poço (AIM).....	74

### DESENVOLVIMENTO DE NANOCAPSULAS DE NUCLEO LIPIDICO NA FORMA DE PÓS

Tabela 8: Rendimento, perda por dessecação, desaglomeração e teor das formulações contendo leucina e lactose com seus adjuvante de secagem.....	75
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

NNI: A Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos EUA.

FDA: Agência *Food and Drug Administration*.

EMA: Agência Europeia de Medicamentos.

MRI: Imagenologia por ressonância magnética.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

PLGA: Poli(L- ácido láctico-co-ácido glicólico).

PCL: Poli(epsilon-caprolactone).

DAP: Dapsona livre preparados com polissorbato 80.

LNC: Nanocápsulas de núcleo lipídico.

LNC-CS: Nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana.

DAP-LNC: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona.

DAP-LNC-CS: Nanocápsulas núcleo lipídico contendo dapsona resvestidas com quitosana.

[ $D_{4,3}$ ]: Diâmetro médio volumétrico.

$i$  :É um índice da população.

$d_i$ : É o diâmetro da partícula da população de  $i$ .

SPAN: É a medida de polidispersão.

$d(0,1)$ : São os diâmetros nos percentis 10% das curvas de distribuição cumulativa de tamanhos com base no volume das partículas.

$d(0,5)$ : São os diâmetros nos percentis 50% das curvas de distribuição cumulativa de tamanhos com base no volume das partículas.

$d(0,9)$ : São os diâmetros nos percentis 90% das curvas de distribuição cumulativa de tamanhos com base no volume das partículas.

PCS: Espectroscopia de correlação de fótons.

$D_H$ : *Diâmetro Hidrodinâmico*.

$k$ : *Constante Boltzmann*.

$f$ : *Coeficiente de atrito de partículas*.

$\eta$ : *Viscosidade do solvente*.

$T$ : *Temperatura absoluta*.

$D$ : *Coeficiente de difusão*.

$z$ : *Potencial Zeta*.

$U_E$ : *Mobilidade eletroforética*.

$\varepsilon$ : Constante dielétrica.

$\eta$ : Viscosidade.

$f(ka)$ : Função de Henry.

CLAE: Cromatografia a líquido de alta eficiência.

CT: Concentração total de dapsona na amostra.

CL: Concentração de dapsona livre.

MET: Microscopia eletrônica de transmissão.

ATCC: Coleção de microorganismos Norte americana.

MIC: Concentração inibitória mínima.

CEPA 01- 05: Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

T<sub>0</sub> Absorbância inicial.

T<sub>24</sub> Absorbância após 24 horas de incubação.

ASP29: Cepa de *Aspergillus Fumigatus*.

ASP30: Cepa de *Aspergillus Fumigatus*.

ASP21: Cepa de *Aspergillus Flavus*.

ASP31: Cepa de *Aspergillus Flavus*.

ASP30: Cepa de *Aspergillus Niger*.

ATCC 16888: Cepa de *Aspergillus Niger*.

AIM: Área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por ml de poço.

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura.

d<sub>z-ave</sub>: Diâmetro médio hidrodinâmico calculado pelo método de Cumulants.

d<sub>h</sub> : Diâmetro médio hidrodinâmico calculado pelo algoritmo de CONTIN.

FWHM: Largura a meia altura da curva de distribuição de diâmetros calculada pelo algoritmo de CONTIN.

PDI: Índice de polidispersão.

EE: Eficiência de encapsulação;

(C): Carbono.

(O): Oxigênio.

(N): Nitrogênio.

(P): Fósforo.

(Al): Alumínio.

MIC<sub>D</sub>: Concentração inibitória mínima de dapsona em µg por ml de poço.

MIC<sub>Q</sub>: Concentração inibitória mínima de quitosana em µg por ml de poço.

PD: Perda por dessecação.

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>233</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
II. 2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
II. 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
III. 3.1. A DAPSONA.....	33
III. 3.2 INFECÇÕES MICROBIOLÓGICAS POR <i>ASPERGILLUS Ssp.</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	34
III. 3.3. A NANOTECNOLOGIA EM MEDICINA .....	35
III. 3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANTIMICROBIANOS.....	37
III. 3.4.1 <i>Nanopartículas poliméricas encapsulando antimicrobianos, síntese e caracterização</i> .....	37
III. 3.4.2. <i>Nanopartículas de quitosana e suas aplicações</i> .....	38
III. 3.4.3. <i>Nanopartículas para inibir o crescimento de estafilococos</i> .....	39
III. 3.4.4. <i>Nanopartículas para inibir o crescimento de aspergillus</i> .....	40
III. 3.5 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS E SUAS APLICAÇÕES COMO ANTIMICROBIANOS .....	41
III. 3.6. PÓS SECOS DE NANOCÁPSULAS OBTIDOS POR <i>SPRAY-DRYING</i> .....	42
III. 3.7. MOTIVAÇÃO DO ESTUDO .....	43
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
IV. 4.1 MATERIAIS.....	47
IV. 4.2. EQUIPAMENTOS.....	47
IV. 4.3 MÉTODOS.....	48
IV. 4.3.1 <i>Preparação das formulações</i> .....	48
IV. 4.3.2 <i>Caracterização físico-química das formulações</i> .....	50
IV. 4.3.2.1. Difração de laser.....	50
IV. 4.3.2.2. Espectroscopia de correlação fótons .....	50
IV. 4.3.2.3. Potencial zeta .....	51
IV. 4.3.2.4. Potenciometria.....	51
IV. 4.3.2.5. Quantificação da dapsona nas formulações.....	51
IV. 4.3.2.6. Eficiência de encapsulação .....	52
IV. 4.3.2.7. Software ImageJ.....	52
IV. 4.3.3 <i>Avaliação da Atividade inibitória</i> .....	53
IV. 4.3.3.1 Atividade antibacteriana.....	53
IV. 4.3.3.2 Atividade antifúngica.....	53
IV. 4.3.3.3 Área aplicada inibitória mínima por ml de poço (AIM) por contagem de colóides e por concentração de quitosana por mL de poço. ....	54
IV. 4.3.4 <i>Obtenção de pós de nanocápsulas por aspersão em Spray-dryer</i> .....	55
IV. 4.3.5 <i>Caracterização dos pós de nanocapsulas de núcleo lipídico</i> .....	55
IV. 4.3.5.1 Rendimento dos pós .....	55
IV. 4.3.5.2. Desaglomeração dos pós por difração de laser.....	55
IV. 4.3.5.3. Perda por dessecação .....	56
IV. 4.3.5.4. Determinação de teor de dapsona nos pós obtidos por aspersão .....	56
IV. 4.3.6 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	56
IV. 4.3.6 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	56
IV. 4.3.7 <i>Análises estatísticas</i> .....	57
<b>V.RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
V. 5.1 DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO DISPERSAS EM ÁGUA .....	61
V. 5.1.1 <i>Nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas ou não com quitosana</i> .....	61
V. 5.1.2. <i>Análises de microscopia eletrônica e microanálise</i> .....	64
V. 5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	70

V. 5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	71
V. 5.4 DESENVOLVIMENTO DE NANOCAPSULAS DE NUCLEO LIPIDICO NA FORMA DE PÓS.....	74
V. 5.4.1 Pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana.....	74
<b>VI. DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>81</b>
<b>VII. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>91</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>IX. ANEXOS .....</b>	<b>111</b>







A nanotecnologia para a saúde humana tem sido focada na produção e no desenvolvimento de novos veículos com fármacos e com nanopartículas que possam ser usados tanto para fins terapêuticos quanto para o diagnóstico de diversas doenças (FERRANTI *et al.*, 1999; COUVREUR *et al.*, 2002). As nanopartículas são consideradas excelentes transportadores de fármacos, pois elas aumentam a sua eficácia e reduzem seus efeitos colaterais (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2009).

Uma alternativa para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas mais eficazes é o uso da nanotecnologia, para assim melhorar entrega dos fármacos em sítios específicos. Dentre os sistemas veiculares propostos para entrega de fármacos, as nanopartículas poliméricas se destacam e tem sido largamente estudadas devido aos seus potenciais terapêuticos (ESPUELAS *et al.*, 2002; MUDSHINGE *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, as nanopartículas vem sendo aplicadas em vários campos da medicina tendo-se destacado consideravelmente entre algumas de suas inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, dentre as quais para a vetorização de antimicrobianos (ESPUELAS *et al.*, 2002; RAMASAMY *et al.*, 2012).

A dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona) é uma sulfona que apresenta mecanismos de dupla ação, como antimicrobiano e anti-inflamatório. Para ação antimicrobiana a dapsona tem efeito bacteriostático inibindo a síntese de ácido diidrofólico através da competição com o ácido *para*-aminobenzóico (WOZEL, BLASUM, 2014).

Paralelamente, a quitosana tem sido um material de escolha para a preparação de nanopartículas para diversas aplicações, devido que esta possui propriedades biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicas. A quitosana é solúvel em meio aquoso acidificado tendo aminas livres como grupo pendente nas suas cadeias poliméricas, contribuindo assim para a formação de amônio quaternário e geração de carga positiva (PHAECHAMUD, 2008).

Adicionalmente, as nanopartículas têm sido investigadas como transportadoras para a entrega intracelular de agentes antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2010). As nanopartículas poliméricas têm sido usadas para inibir uma variedade de espécies bacterianas *in vitro*, incluindo alguns microrganismos multirresistentes (CHEN *et al.*, 2014). As nanopartículas exibem boas atividade antibacteriana e antifúngica contra cepas multirresistentes aos medicamentos convencionais proporcionando que os tratamentos sejam mais específicos e de forma mais eficazes (WEI *et al.*, 2009; ITALIA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2007).

As nanopartículas poliméricas são conhecidas como nanoesferas e nanocápsulas conforme sua composição química e organização estrutural (MORAHUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010). Um tipo específico de nanocápsulas é a nanocápsula de núcleo lipídico (POHLMANN *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que a utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico como transportadoras de fármacos apresentaram bons resultados no tratamento de doenças inflamatórias, doença de alzheimer e câncer (CATTANI *et al.*, 2010; FROZZA *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 (POHLMANN *et al.*, 2013), com polissorbato 80 e fosfatidilcolina (BENDER *et al.*, 2012), e com fosfatidilcolina-quitosana e polissorbato 80, como funcionalização de superfície (BENDER *et al.*, 2012).

A técnica de *spray-drying* é utilizada em diversas áreas do conhecimento como: farmacêutica, alimentícia, química e de polímeros. Na indústria farmacêutica esta técnica pode ser utilizada para produzir pós particulados que serão administrados por via pulmonar, nasal e/ou parenteral (VEHRING, FOSS, LECHUGA-BALLESTEROS, 2007). Nosso grupo de pesquisa foi o pioneiro em usar a técnica de *spray-drying* para secar as dispersões aquosas de nanopartículas poliméricas (MULLER *et al.*, 2000). Diferentes exemplos de microagregados de nanopartículas poliméricas foram desenvolvidos com auxílio de dióxido de silício, como adjuvante de secagem, e avaliados quanto aos seus aspectos físico-químicos e farmacêuticos (BECK *et al.*, 2008). O processo foi utilizado por outros pesquisadores que propuseram o uso de adjuvantes solúveis em água na produção dos pós de nanopartículas (TEWA-TAGNE, BRIANÇON, FESSI, 2007).

Como hipótese deste estudo, desenvolvemos e caracterizamos nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana para assim associar efeitos antimicrobianos, do fármaco e de material de revestimento das nanocápsulas. Para tanto, encapsulamos a dapsona nas nanocápsulas com o propósito de obter sua dupla atividade antimicrobiana, associada à da quitosana, material de revestimento. Posteriormente, as nanocápsulas contendo dapsona e revestidas com quitosana foram secas pela técnica de *spray-drying* a fim de desenvolver uma plataforma tecnológica para a obtenção de produtos intermediários e finais, para futuras aplicações pulmonares ou tópicas dos pós de nanocápsulas.

## II. OBJETIVOS

---



## II. 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana como uma plataforma tecnológica com potenciais aplicações farmacêuticas.

## II. 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Desenvolver as formulações e caracterizá-las quanto à distribuição de diâmetro de partículas, diâmetro médio de partículas, potencial zeta, pH, aspecto morfológico.
- Avaliar as formulações empregando modelos de microdiluição em série para determinação da concentração inibitória mínima em bactérias e fungos.
- Secar a dispersão aquosa de nanocápsulas contendo dapsona empregando leucina ou lactose em concentrações variadas e caracterizar os pós resultantes obtidos pela técnica de *spray-drying*.



### III. REVISÃO DE LITERATURA

---





### III. 3.1. A DAPSONA

Em 1908 a dapsona foi sintetizada por Fromm e Wittmann (FROMM, WITTMANN, 1908), naquela época a dapsona não era considerada um agente terapêutico. As sulfas começaram a serem pesquisadas em 1937 quando dois grupos de pesquisa, sendo um da Inglaterra e o outro da França começaram a investigar a dapsona como sendo um possível agente antimicrobiano (WOZEL, BLASUM, 2014).

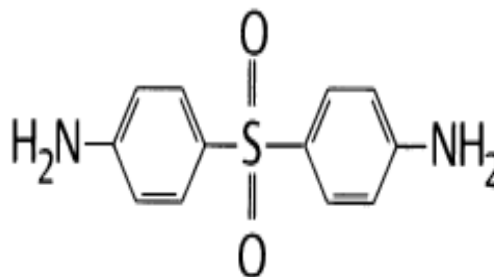
A dapsona (fig.1) se caracteriza por ter dupla ação terapêutica, ela apresenta efeito antimicrobiano e anti-inflamatório. Há alguns anos, os efeitos adversos hematológicos da dapsona geraram grandes estratégias para produzir sulfonas com maior benefício e menor risco (WOZEL, BLASUM, 2014).

A dapsona é quimicamente um derivado da anilina. Como uma sulfona a dapsona apresenta um átomo de enxofre ligado a dois átomos de carbono em sua estrutura química. Após sua administração em via oral, a dapsona é quase completamente absorvida no intestino e apresenta uma biodisponibilidade superior a 86% (AHMAD, ROGERS, 1980; ZUIDEMA, HILBERS-MODDERMAN, MERKUS, 1986).

Como um agente antimicrobiano a dapsona apresenta ação bacteriostática, pois ela inibe a síntese de ácido diidrofolico por meio da competição com ácido *para*-aminobenzóico pelo sítio ativo da síntese diidropteroato, equivalente assim à ação das sulfonamidas (COLEMAN, 1993; WOZEL, BLASUM, 2014).

As sulfonas podem inibir o crescimento de diversas bactérias patogênicas, como: micobactérias, estafilococos, pneumococos, estreptococos dentre outras (WOZEL, BLASUM, 2014). Estudo *in vitro* com dapsona demonstrou que houve atividade antibacteriana contra o *Propionibacterium acnes*, o qual é uma bactéria gram-positiva com crescimento anaeróbico e está envolvida na patogênese da acne. Devido a suas atividades antimicrobianas, a dapsona é muito usada para o tratamento de algumas doenças infecciosas (GRUNWALD, AMICHAH, 1996).

Dentre os principais efeitos adversos causados pelo uso da dapsona, estão: metahemoglobinemia, agranulocitose e anemia hemolítica (GORAN *et al.*, 2010; KANNAN *et al.*, 2009). No entanto, a dapsona continua sendo um fármaco de escolha para as mais variadas terapias que lhes são indicadas. Visando uma prevenção efetiva e uma redução dos efeitos adversos foram propostos sistemas nanocarregadores contendo a dapsona para entrega pulmonar (ORTIZ *et al.*, 2015).



Esquema 1: Estrutura química da dapsona.

### III. 3.2 INFECÇÕES MICROBIOLÓGICAS POR *ASPERGILLUS SSP.* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

O *Aspergillus fumigatus* é considerado um fungo filamentosos e seu desenvolvimento é beneficiado pela umidade, calor e matérias orgânicas. Seus conídios são liberados para a atmosfera e apresentam diâmetros com cerca de 2 a 3 µm os quais podem alcançar os alvéolos pulmonares originando infecções (CHABI *et al.*, 2015).

A concentração de esporos no ar aumenta significativamente em locais próximos de construções civis, no entanto, é essencial que se realize um monitoramento principalmente no caso de construções em âmbito hospitalares. Com o aumento de conídios no ar elevam-se os riscos dos pacientes contraírem aspergilose, principalmente quando susceptíveis (CHABI *et al.*, 2015).

Infecções por aspergilose saprofítica ocorre em consequência da colonização pré-existente por *Aspergillus* em uma cavidade pulmonar ou brônquica. A combinação de conglomerados de hifas do *A. fumigatus* gera inflamações nas células, no muco e nos detritos celulares (LATGE, 1999).

O *Aspergillus flavus* é um fungo saprófito onipresente encontrado em solos que foi descrito em 1809 (KRISHNAN, MANAVATHU, CHANDRASEKAR, 2008). O *A. flavus* pode provocar micoses nos seres humanos e também em animais. Nos humanos, o *A. flavus* é considerado a segunda causa mais comum de aspergilose invasiva o que representa cerca de 10% a 20% das infecções fúngicas (KRISHNAN, MANAVATHU, CHANDRASEKAR, 2008).

Em locais secos e quentes como em alguns nos países da África e do Oriente Médio, o *A. flavus* é encontrado na maioria dos casos de sinusites fúngicas e infecções

cutâneas. Os animais como os coelhos, galinhas e perus também podem ser afetados pela aspergilose e por infecções oriundas do *A. flavus* (AMARE, KELLER, 2014).

O *Aspergillus niger* é outro fungo que tem sido investigado no meio industrial há vários anos. O *A. niger* é um fungo filamentosos que cresce aerobiamente em matéria orgânica e também pode ser encontrado em solos, compostos e em decomposição de material vegetal. O mesmo possui a capacidade de crescer em diversas gamas de temperaturas na faixa de 6-47 °C, principalmente, em temperatura elevada entre 35-37 °C (SCHUSTER *et al.*, 2002).

O *A. niger* cresce em uma ampla faixa de pH que pode variar entre 1,4 - 9,8 podendo também causar infecções pulmonares (SCHUSTER *et al.*, 2002). O *A. niger* também é considerado como um fungo não patogénico e é encontrado no meio ambiente. Os seres humanos estão todos dias expostos a seus diversos esporos, no entanto, a doença pode não apresentar sintomas, e, assim pode agravar mais o quadro infeccioso (DENNING, 1998; SCHUSTER *et al.*, 2002).

O *Staphylococcus aureus* é um membro da família Micrococcaceae. O *S. aureus* é um microrganismo coco gram-positivo diferenciando-se das outras espécies de estafilococos por meio da sua pigmentação ouro das colônias, além dos resultados positivos em teste de coagulasse, fermentação, manitol e testes desoxirribonuclease (LOWY, 1998; CHAMBERS, DELEO 2009).

O genoma do *S. aureus* é constituído por um cromossomo circular com aproximadamente 2800 pb. Seus genes regulam a virulência e a resistência aos antibióticos e são detectados no cromossomo. As bacteremias estafilocócicas podem ser perigosas em virtude da capacidade de causar endocardite, infecção metastática ou síndrome de sépsis. Os estafilococos aderem nas células endoteliais e se ligam por meio dos receptores de adesina. Estudos *in vitro* demonstraram que após a adesão das cepas de *S. aureus* estas são fagocitados pelas células endoteliais (LOWY, 1998; CHAMBERS, DELEO 2009).

### III. 3.3. A NANOTECNOLOGIA EM MEDICINA

A Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos EUA (NNI) tem por finalidade desenvolver e fazer a implantação de tecnologias em nanoescala para benefício da população. A nanotecnologia é definida com base em seu tamanho, podendo variar entre 1 a 100 nm. Outra definição, como a da Agência *Food and Drug Administration* (FDA) definem a nanotecnologia com base em dimensão entre 1 e 1000 nm.

Paralelamente, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) definiu a nanotecnologia na faixa de 0,2 a 100 nm em tamanho, porém no decorrer dos anos ampliou a definição para menos de 1.000 nm em tamanho (SMITH, SIMON, BAKER Jr, 2013).

Segundo a ISO TC 229 a nanotecnologia deve ter no mínimo um dos subsequentes aspectos:

“– Entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho permite novas aplicações;

– Utilização das propriedades dos materiais em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que exploram essas novas propriedades (ISO TC 229) ”

Já a Comissão Europeia em 2011 publicou suas recomendações para a definição de um nanomaterial. Segundo o documento:

“ Um nanomaterial é definido como aquele de origem natural, incidental ou manufaturado contendo partículas em estado não-ligado, aglomerado ou agregado para os quais 50% ou mais das partículas da distribuição por número, ou uma ou mais das dimensões externas, situa-se na faixa entre 1 e 100 nm (THE EUROPEAN COMMISSION, 2011) ”.

As nanopartículas vem despertando cada vez mais o interesse para a terapêutica e para o diagnóstico das doenças devido às suas propriedades físico-química e biológicas associadas (COUVREUR *et al.*, 2002; KREUTER, 2007). Aplicações biomédicas com nanopartículas incluem a entrega de fármacos, agentes de rastreamento, vetores em terapia genética, tratamentos de hipertermia, além de serem usadas como agentes em imagenologia por ressonância magnética (MRI) de contraste (BOISSELIER, ASTRUC, 2009; PANKHURST *et al.*, 2009; THANH, GREEN, 2010).

Um dos pioneiros no desenvolvimento de nanopartículas com aplicações terapêuticas foi o professor Patrick Couvreur que se juntou ao grupo do professor Peter Paul Speiser por alguns meses em 1976 (COUVREUR *et al.*, 1977). O Prof. Couvreur começou a produzir as primeiras nanopartículas a base de polímeros acrílicos utilizando um processo de preparação *in situ* de poli(cianoacrilato de metila) ou poli(cianoacrilato de etila) (COUVREUR *et al.*, 1979).

### III. 3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANTIMICROBIANOS

#### III. 3.4.1 Nanopartículas poliméricas encapsulando antimicrobianos, síntese e caracterização

Agentes com propriedades antimicrobianas e antifúngicas já vem sendo nanoencapsulados em nanopartículas no decorrer dos anos. Além dos agentes antimicrobianos que podem ser nanoencapsulados existem alguns materiais com propriedades antimicrobianas que são usados para produzir as nanopartículas. Os devidos materiais tem como função melhorar os efeitos antimicrobianos (BLANCO-PADILLA *et al.*, 2014).

Nanopartículas poliméricas para entrega de antibióticos tem o potencial de fornecer um maior tempo de ação nos locais das infecções obtendo assim uma liberação sustentada e direcionada para o local específico da infecção, em efeitos terapêuticos (HADINOTO, CHEOW, 2014).

Em outro estudo as nanopartículas poliméricas contendo tobramicina apresentaram boa eficácia contra infecções causadas por *Pseudomonas Aeruginosa*. O diâmetro médio medido por espectroscopia de correlação de fótons foi 505 nm sendo confirmado por meio microscopia eletrônica de varredura, evidenciando assim nanopartículas com estruturas esféricas. O tamanho e o índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas foram mantidas durante 96 horas sob condições a 37°C (DEACON *et al.*, 2015).

Por meio da nanoencapsulação de eugenol e trans-cinamaldeído em sistema nanoparticulado houve uma liberação mais prolongada (por 72 horas) do antimicrobiano. Os dados demonstraram uma inibição no crescimento de *Listeria spp.* e *Salmonella spp.* com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 10 a 20 mg mL<sup>-1</sup> (GOMES *et al.*, 2011).

Nanopartículas contendo clorafenicol exibiram propriedades estáveis após 6 meses de armazenamento em temperatura de 4°C a 25°C. Esta formulação apresentou atividades antimicrobianas contra cerca de dez isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) quando comparados com o fármaco livre, de modo geral, esta nanoformulação tende a ser um novo e promissor candidato para entrega de antimicrobiano (KALITA *et al.*, 2015).

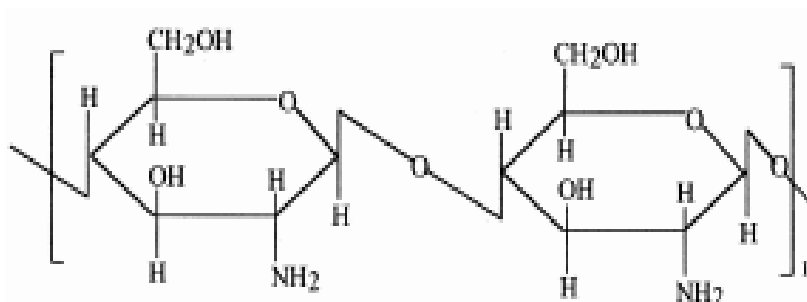
As nanocápsulas obtidas a partir de copolímero de PLGA contendo penicilina se mantiveram estáveis por mais de 120 dias quando armazenada a 4°C. A eficiência de encapsulação foi de 85% e os resultados apresentaram atividades antimicrobianas

*in vitro* contra cepas de *Streptococcus Pyogenes* (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000).

Por meio da nanoencapsulação do extrato de *G. glabra* em nanocápsulas foi obtido uma eficácia antibacteriana contra espécies de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Bacillus cereus*) e em bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) (ESMAEILI, RAFIEE, 2015).

### III. 3.4.2. Nanopartículas de quitosana e suas aplicações

A quitosana (fig. 2) é um produto desacetilado de quitina e é solúvel em ácidos diluídos como o ácido acético, ácido fórmico, dentre outros. Além disso, a quitosana é um biopolímero que proporciona uma condutividade iônica quando esta dissolvido em ácido acético (KUMAR, 2000).



Esquema 2: Estrutura química da quitosana

Devido suas propriedades físico-química a quitosana é utilizada como carregadores para diversos fármacos e para aplicações de liberação controlada. Tem sido explorado seu potencial para a administração oral e nasal de fármacos polares. Em virtude de suas bioatividades, a quitosana em si quando associadas com formulações contendo fármacos podem apresentar efeitos terapêuticos duplo (GAVHANE, GURAV, YADAV 2013).

A quitosana também é usada para inibir o crescimento de *Escherichia coli* e alguns fungos como o *Fusarium*, *Alternaria* e *Helminthosporium*. A quitosana é catiônica e tem grupos amino os quais provavelmente se ligam aos grupos aniônicos destes microrganismos resultando em uma inibição de crescimento (KUMAR, 2000).

Devido à elevada densidade de carga positiva da quitosana a qual é intrinsecamente antimicrobiana, o polieletrólito se liga à, e subsequentemente

interrompe membranas bacteriana. Um desafio em trabalhar com a quitosana é que a sua solubilidade está limitada às soluções aquosas ácidas suaves, pois tem um pKa de 6,5 (BIRCH, SCHIFFMAN, 2014).

Quando a quitosana é dimensionada para escala nano esta terá uma superfície superior em proporção em volume traduzindo-se numa maior densidade de carga de superfície com aumento da afinidade para bactérias e fungos, e assim uma maior atividade antimicrobiana (Qi, *et al.*, 2005).

A nanotecnologia aplicada com à quitosana apresentam inúmeras aplicações na era da medicina, entre as quais, como veículos de entrega de fármacos tornando os sistemas mais eficazes (AGRAWAL, STRIJKERS, NICOLAY, 2010). As nanopartículas poliméricas de quitosana tem por finalidade exercer uma dupla função, como um excipiente para a produção do sistema e também como um antimicrobiano (HA, *et al.*, 2013).

Nanopartículas poliméricas de quitosana já vem sendo estudadas e analisadas quanto as suas potenciais atividades antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (NEILANDS *et al.*, 2011; SHRESTHA, KISHEN, 2012).

Nanopartículas e microcápsulas à base de quitosana quando usados podem prolongar a ação e aumentar biodisponibilidade proporcionando assim uma liberação controlada de fármacos (PANDEY, KHULLER, 2004; POURSHAHAB *et al.*, 2011).

Em outro estudo, as nanopartículas de quitosana demonstraram melhor atividade antimicrobiana contra bactérias. Verificou-se ainda que a variação de tamanho, forma e carga superficial das nanopartículas de quitosana resultou na variação significativa na sua atividade antibacteriana do *Staphylococcus aureus*. A pesquisa mostrou também melhores resultados quando as nanopartículas de quitosana foram sintetizadas em solução de quitosana com pH 6,0 (ALI *et al.*, 2010).

### **III. 3.4.3. Nanopartículas para inibir o crescimento de estafilococos**

Embora os desafios terapêuticos atuais incluam o rápido surgimento de organismos multirresistentes no caso de patógenos Gram-positivos, bactérias entéricas Gram-negativos, e *Mycobacterium tuberculosis* diversos agentes antimicrobianos tradicionais têm sido utilizados para o tratamento das doenças infecciosas nas últimas décadas (HUH, KWON, 2011; KOUL *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas como sendo veículos de entrega de antimicrobianos para doenças infecciosas humanas requerem uma

concepção racional do modelo de polímero assim como uma abordagem sintética eficiente, por exemplo, a carga do fármaco/liberação, estabilidade das partículas, dentre outras características (LIM *et al.*, 2015).

Para tanto foram propostas nanopartículas contendo nisina para testar a sua eficácia antibacteriana em comparação com a nisina livre contra *Staphylococcus aureus*. Os testes de contagem de antimicrobianos revelaram que a nisina livre não pode ser tão eficaz e eficiente quanto como as nanopartículas contendo nisina para inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus* (ZOHRI *et al.*, 2010).

Nanopartículas de quitosana-tripolifosfato contendo curcumina podem potencialmente ser utilizadas em sistemas de entrega de fármacos e aplicadas como uma estratégia para ativar especificamente sistemas antibacterianos. Este sistema apresenta-se como sendo bom candidato para a segmentação dos fármacos em infecção bacteriana incluindo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (JAHROMI *et al.*, 2014).

Nanopartículas à base de quitosana apresentaram adequados perfis de atividades antimicrobianas contra bactérias. Por meio do uso das nanopartículas os dados mostraram que estes sistemas possuem atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus* (ALI *et al.*, 2010).

Em outro sistema nanoestruturado houve uma inibição de grande parte das propriedades de formação de colonização, antibiofilme e antimicrobianas. Os resultados demonstraram uma inibindo de crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Pseudomonas aeruginosa* em biofilmes (HOLBAN *et al.*, 2014).

#### **III. 3.4.4. Nanopartículas para inibir o crescimento de *Aspergillus ssp.***

Os fungos patogênicos oportunistas que causam infecções com risco de vida incluindo a *Aspergilose*, *Candidíase* e *Criptococose* estão subindo exponencialmente em pacientes transplantados, diabéticos, com câncer e em pacientes com imunodeficiências congênitas e adquiridas (ERJAVEC, KLUIN-NELEMANS, VERWEIJ, 2009; NEOFYTOS *et al.*, 2009). *Aspergilose* invasiva é uma das principais causas de morte em pacientes imunossuprimidos (GROLL *et al.*, 1996).

Os fungos patogênicos tornaram-se resistentes a diversos agentes antifúngicos, com isso há a necessidade do desenvolvimento de formulações com antimicrobianos mais eficazes (RAI, YADAV, GADE, 2009). Apesar dos avanços de tratamento a morbidade e mortalidade associadas com *aspergilose* invasiva



continuam sendo altas, ocorrendo em cerca de 70-90% em pacientes imunocomprometidos (UPTON *et al.*, 2007).

Peng *et al.*, 2008 estudaram a encapsulação de voriconazol em nanopartículas poliméricas de PLGA. Os resultados mostraram que quando se tem uma encapsulação de voriconazol a eficácia antifúngica é maior quando comparados com voriconazol livre, tanto em efeitos *in vitro* e *in vivo* (PENG *et al.*, 2008).

Nanopartículas de anfotericina-B contendo fosfatidilcolina e quitosana foram propostas para inibir o crescimento de fungos. As mesmas apresentaram uma gama de tamanhos variando de 161,9 - 230,5 nm com uma eficiência de encapsulação de 70-75% e seu potencial zeta positivo de 26,6 - 38,3 mV. Estas nanopartículas apresentaram susceptibilidade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* e de *Aspergillus fumigatus*, sendo mais eficazes do que a formulação comercial quando comparadas (CHHONKER *et al.*, 2015).

Através de estudo realizado com nanopartículas lipídicas sólidas contendo itraconazol preparadas a partir de ácido esteárico e ácido palmítico os resultados exibiram uma inibição de crescimento contra o *Aspergillus flavus*, indicando uma adequada eficácia fúngica (MOHANTY *et al.*, 2015).

Nanopartículas de prata com tamanho de 2 e 45 nm apresentaram atividade para inibir o crescimento dos fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Análise de microscopia óptica revelou alterações nas hifas das estruturas do *Fusarium* sob tratamento com nanopartículas, demonstrando assim que houve uma interação entre as nanopartículas e o *Fusarium* (MATEI *et al.*, 2015).

Em outra pesquisa com nanopartículas de prata sintetizados os dados mostraram uma maior atividade antifúngica contra o *Aspergillus sp.* dan *Rhizopus sp.* com a inibição do crescimento das hifas fúngicas. (MEDDA *et al.*, 2015).

### III. 3.5 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS E SUAS APLICAÇÕES COMO ANTIMICROBIANOS

As nanocápsulas são sistemas nanoparticulados contendo um núcleo e uma parede. O núcleo é composto por uma solução aquosa ou mais comumente por uma substância líquida lipofílica, geralmente um óleo fixo. As nanocápsulas podem ser obtidas por diferentes métodos, como por exemplo a polimerização interfacial de monômeros ou a deposição interfacial de polímeros pré-formados (COUVREUR *et al.*, 2002; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010).

As nanocápsulas também são utilizadas como veículos para administração em várias vias biológicas. A utilização destes sistemas nanoestruturados catiônicos *a priori* parecem serem suficientes para que ocorra uma ruptura da membrana bacteriana e assim melhorar os efeitos de resistência aos fármacos antimicrobianos (FERNANDES *et al.*, 2014).

Nanocápsulas poliméricas demonstraram muitas vantagens tais como a sua capacidade de exibir uma liberação do fármaco sustentada, evitando assim degradação química do mesmo (DASH, BADIREENATH KONKIMALLA, 2012). Após serem desenvolvidas e testadas com sucesso, uma formulação de nanocápsulas e exibiu atividades contra várias estirpes de bactérias. Os resultados demonstraram alta versatilidade para poder encapsular diversos compostos químicos para aplicações farmacêuticas (STEELANDT *et al.*, 2014).

Nanocápsulas de PCL contendo clorexidina preparadas pelo método de deposição interfacial polímero exibiram tamanho uniforme com boa eficiência de encapsulação. O estudo *in vitro* demonstrou atividade contra várias bactérias, no entanto são necessários estudos *in vivo* para confirmar estes achados. Os resultados mostraram que as nanocápsulas de clorexidina em suspensão aquosa tendo um tamanho de 200-300 nm e uma carga positiva exibiram concentrações inibitórias mínimas adequadas para inibir o crescimento várias bactérias (LBOUTOUNNE *et al.*, 2002).

Zhou *et al.*, 2013 desenvolveram com sucesso nanocápsulas para entrega de fármacos com potencial antibacteriano. Os dados apresentaram uma excelente eficácia para inibir o crescimento de bactérias tanto Gram-positivas e Gram-negativas (ZHOU *et al.*, 2013).

Em outro estudo as nanocápsulas e as nanoesferas exibiram uma liberação prolongada e controlada de triclosan. O efeito antimicrobiano foi também testado significativamente, e especialmente em bactérias Gram-positivas. O resultados do estudo mostrou que a encapsulação do triclosan nestes sistemas exibiram boas atividades para inibir os crescimentos bacterianos (VALENTE *et al.*, 2013).

### III. 3.6. PÓS SECOS DE NANOCÁPSULAS OBTIDOS POR *SPRAY-DRYING*

A secagem por aspersão é uma técnica que vem sendo muito aplicada para secar suspensões, soluções e emulsões aquosas ou orgânicas na indústria biofarmacêutica, eletrônica, alimentar, química e farmacêutica. Na indústria

farmacêutica a secagem é muito usada para obter substâncias ativas na forma de pó, como por exemplo, antibióticos, tais como tetraciclina, aureomycin, ampicilina, terramicina, penicilina, estreptomicina dentre outros (JAIN *et al.*, 2011).

A secagem envolve um amplo processo no qual diversos parâmetros de processamento podem influenciar as características do produto final desejado, porém salienta-se a importância em se determinar os parâmetros do processo em estudos de pré-formulação com vistas para a obtenção de produtos com características apropriadas (AUNDHIA *et al.*, 2011; SOLLOHUB, CAL, 2009).

Nanocápsulas contendo melatonina secas pela técnica de spray-drying foram preparadas utilizando excipientes solúveis em água, com adjuvantes de secagem (lactose ou maltodextrina). Os hidrogéis preparados com nanocápsulas contendo melatonina foram capazes de controlar a velocidade de liberação de melatonina. Este estudo representa uma estratégia promissora para a utilização de nanocápsulas secas por aspersão no desenvolvimento de formas de dosagem semi-sólidas, para administração transdérmica nanomedicamentos (HOFFMEISTER *et al.*, 2012).

Por meio de um estudo constatou que a adição de pós secos por aspersão de nanocápsulas núcleo lipídico contendo tretinoína houve uma melhoria significativa na fotoestabilidade da tretinoína em comparação com a formulação que contém o fármaco não encapsulado (MARCHIORI *et al.*, 2013).

Nanocápsulas de gelatina contendo com fenofibrato preparadas utilizando o método de evaporação de solvente por meio da técnica de secagem por aspersão podem ser um potencial produto farmacêutico para a administração do fenofibrato por via oral, além disso este sistema apresentou melhor solubilidade aquosa, velocidade de dissolução e biodisponibilidade oral de fenofibrato quando comparados com o fármaco em pó puro (YOUSAF *et al.*, 2015).

### III. 3.7. MOTIVAÇÃO DO ESTUDO

Os recentes avanços na nanotecnologia têm melhorado constantemente a vida dos seres humanos bem como a eficácia melhorada dos fármacos. A nanotecnologia tem oferecido vários benefícios tais como a entrega lenta e controlada dos fármacos, a especificidade do alvo, melhor eficácia e menos efeitos colaterais. Estas são propriedades indispensáveis para a concepção de fármacos já existentes e novos.

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado

podem ser usadas como um biomaterial eficiente para aplicações biomédicas, tais como a entrega da dapsona para inibir a atividade bacteriana e fúngica. Com relação à escolha do polímero a poli( $\epsilon$ -caprolactona) tem sido um dos mais amplamente utilizados devido as suas características de biocompatibilidades e biodegradabilidades.

As nanocápsulas são estruturas coloidais com um diâmetro em escala submétrica que varia de 10 a 1000 nm. No decorrer dos anos diversos pesquisadores têm estudado o controle e a liberação das substâncias para diversos sítios de ações específicos no organismo humano com a finalidade de melhorar os resultados das terapias farmacológicas.

Também há o advento do uso de biopolímeros, no caso à quitosana para o revestimento da superfície das nanocápsulas. Quando a quitosana está revestindo uma partícula em escala nano ela aumenta a densidade de carga de superfície, com isso irá aumentar a afinidade com as bactérias e os fungos proporcionando assim uma maior atividade antimicrobiana.

Os pós de nanocápsulas foram desenvolvidos com a finalidade de serem direcionados como transportadores para a via respiratória a fim de combater a aspergilose invasiva pulmonar. Além disso, os pós poderão ser usados para a produção e desenvolvimento de géis de nanocápsulas e assim serem utilizados para inibir a atividade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Desta forma, visamos à obtenção de uma plataforma tecnológica para futuras aplicações farmacêuticas com os pós secos das nanocápsulas.

#### **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

---



#### IV. 4.1 MATERIAIS

- ❖ Poli(epsilon-caprolactone) (PCL) (Mw = 14 000), Sigma-Aldrich (U.S).
- ❖ Monoestearato de sorbitano (Span 60<sup>®</sup>), Sigma-Aldrich (U.S).
- ❖ Quitosana de baixo peso molecular (Mw 50.000-190.000 g mol<sup>-1</sup>, 75-85% desacetilado), Sigma-Aldrich (U.S).
- ❖ Triglicerídeo caprílico/cáprico, Delaware (Brasil).
- ❖ Polissorbato 80, Delaware (Brasil).
- ❖ Fosfatidilcolina, lecitina S75, Gerbras (Brasil).
- ❖ Dapsona, DEG (Brasil).
- ❖ Leucina, DEG (Brasil).
- ❖ Lactose, DEG (Brasil).
- ❖ Ácido Morfolinopropanosulfônico (MOPS), brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], Sigma-Aldrich (U.S).
- ❖ Caldo Mueller Hinton, Sigma-Aldrich (U.S).
- ❖ RPMI 1640, Gibco (USA).
- ❖ Cacodilato, Merck KGaA (Alemanha).
- ❖ Glutaraldeído, Merck Schuchardt OHG (Alemanha).
- ❖ Paraformaldeído, Labsynth (Brasil).
- ❖ Ultrafree, Amicon Ultra, 0.5 mL, 10k, (EUA.)
- ❖ Funil, Hands pet, 25 mL, Eppendorf (Brasil)
- ❖ Membrana de filtração, Sartorius Stedim, 0,45 µm, Biotech, (Alemanha)
- ❖ Coluna de cromatografia, LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (5 µm)
- ❖ Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico.

#### IV. 4.2. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica, BEL (Brasil)
- Ultrassom, 220 watts RMS UNIQUE (Brasil)
- Banho-maria, QUIMISERV (Brasil)
- Evaporador rotativo, BUCHI B-480
- Mastersizer 2000<sup>®</sup>, Malvern Instrument (UK)
- Zetasizer<sup>®</sup> ZS Nano Zen3600, Malvern Instrument (UK)
- Potenciômetro DM-22, Digimed (Brasil).
- Centrífuga Eppendorf, JOUAN MR23 (UK)

- Mini Spray-Dryer B-290, BUCHI (Suíça)
- Balança de perda por dessecação, OHAUS MB 25 (USA)
- Cromatografia a líquido de alta eficiência, HPLC LC 20, SHIMADZU (Japão)
- Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-6060, JEOL (Japão), instalado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), UFRGS.
- Microscópio Eletrônico de Varredura MEV EVO, CARL ZEISS (Alemanha), instalado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) UFRGS
- Microscópio eletrônico de Transmissão MET, JEM-1200, ExII, JEOL (Japão), instalado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) UFRGS
- Estufa bacteriológica, DeLeo (Brasil)

#### IV. 4.3 MÉTODOS

##### IV.4.3.1 Preparação das formulações

Cinco formulações foram preparadas para os experimentos:

1. Dapsona livre (DAP) preparada com dapsona e polissorbato 80;
2. Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC);
3. Nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana (LNC-CS);
4. Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC) e;
5. Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestidas com quitosana (DAP-LNC-CS).

A composição das formulações estão descritas na tabela 1. Todas as formulações foram realizadas em triplicata de lotes (n = 3).

A formulação DAP (10 mL) foi preparada em balão volumétrico dispersando-se a dapsona (10 mg) e o polissorbato 80 (80 mg) em água ultrapura.

A formulação LNC (nanocápsulas de núcleo lipídico) foi preparada pela metodologia descrita previamente (BENDER *et al.*, 2012) (fig.3). Uma fase orgânica que contém o poli( $\epsilon$ -caprolactona) (0,100 g), monoestearato de sortibano (0,040 g) e triglicérido caprílico/cáprico (0,120 g) foram dissolvidos em acetona (30 mL), a 40 °C. Em seguida foi adicionada uma solução etanólica (4 ml) com fosfatidilcolina (0,06 g). Com o uso de um funil, esta mistura foi injetada numa solução aquosa (60 ml) contendo polissorbato 80 (0,08 g) a 40 °C. Uma solução turva branca foi formada instantaneamente, a qual foi mantida sob agitação por 10 min a 40 °C. Os solventes orgânicos (acetona e etanol) foram removidos e a formulação concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C para um volume final de 10 mL.



A formulação LNC-CS foi obtida a partir do revestimento da formulação LNC. Uma solução de ácido acético a 1% contendo quitosana a 1% (m/v) (1 ml) foi adicionada em 9 ml de formulação LNC-CS. A reação foi mantida sob agitação magnética durante 4 horas na temperatura ambiente (22-25 °C).

A formulação DAP-LNC foi obtida conforme descrito para a formulação LNC (acima) adicionando-se dapsona (0,010 g) na solução de acetona juntamente com os demais materiais estruturantes das nanocápsulas. E a formulação DAP-LNC-CS foi obtida por revestimento da formulação DAP-LNC com quitosana, conforme descrito na preparação da formulação LNC-CS (acima).

Tabela 1: Composição quali-quantitativa das formulações em miligramas para 10 mL de formulação final (g/mL).

Formulações	DAP	LNC	LNC-CS	DAP-LNC	DAP-LNC-CS
Poli(epsilon-caprolactona)	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Monoestearato de sorbitano	-	0,04	0,04	0,04	0,04
Dapsona	0,01	-	-	0,01	0,01
Triglicerídeo caprílico/cáprico	-	0,12	0,12	0,12	0,12
Fosfatidilcolina	-	0,06	0,06	0,06	0,06
Polissorbato 80	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Quitosana	-	-	0,01	-	0,01

DAP: dapsona livre; LNC: nanocápsulas de núcleo lipídico; LNC-CS: nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana; DAP-LNC: nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e DAP-LNC-CS: nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona revestidas com quitosana.  
(-): sem componente.

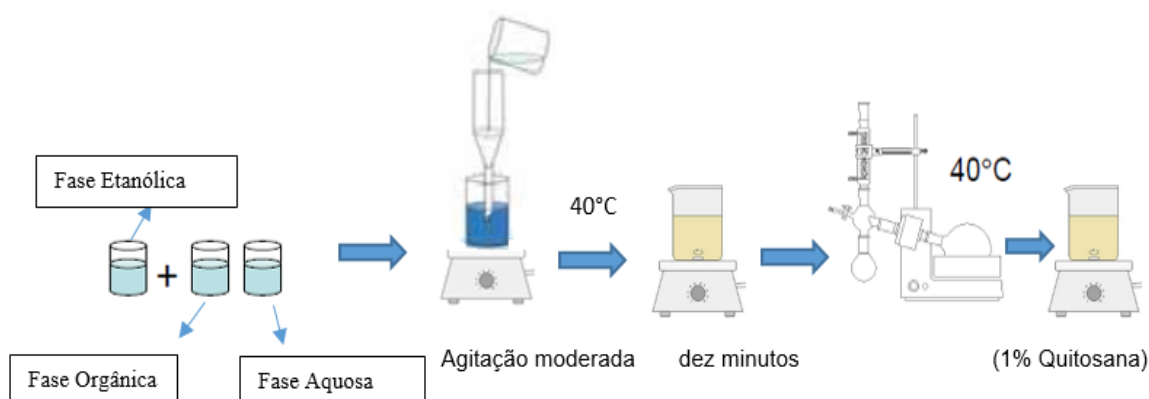


Figura 3: Esquema ilustrativo do método de preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico (deposição interfacial de polímero pré-formado).

#### IV.4.3.2 Caracterização físico-química das formulações

##### IV. 4.3.2.1. Difração de laser

A distribuição granulométrica do perfil de cada formulação foi determinada por difração de laser em Mastersizer® 2000. Cada amostra foi diretamente adicionada na unidade úmida do equipamento contendo 100 a 150 mL de água destilada. A alíquota foi suficiente para uma obscuração entre 1% e 8%. Para cálculo dos diâmetros médios por volume das partículas  $[D_{4,3}]$  foi usada a teoria de Mie (Equação 1). A densidade de partículas usadas para calcular as áreas específicas foram de  $1\text{g/cm}^3$ .

(Equação 1)

$$D_{4,3} = \frac{\sum_i d_i^4}{\sum_i d_i^3}$$

onde  $i$  é um índice da população, e  $d_i$  é o diâmetro da partícula da população de  $i$ .

O SPAN é a medida da polidispersão baseada na largura da curva de distribuição de tamanho das partículas. Quanto mais estreita esta distribuição menor será o SPAN. O SPAN é calculado pela seguinte equação (Equação 2).

(Equação 2)

$$\text{SPAN} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)}$$

O  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  e  $d(0,9)$  são os diâmetros nos percentis 10%, 50% e 90% das curvas de distribuição cumulativa de tamanhos com base no volume das partículas.

##### IV. 4.3.2.2. Espectroscopia de correlação fótons

O diâmetro médio hidrodinâmico e o índice polidispersão da curva de distribuição de tamanho de partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) usando um Zetasizer® Nano ZS após uma diluição de 500x em água ultrapura (Millipore®, 0,45 m). O cálculo do diâmetro médio hidrodinâmico de cada amostra foi baseado na equação de *Stokes-Einstein* (Equação 3).

A equação de **Stokes-Einstein** para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico é:

(Equação 3).

$$D_H = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

$D_H$ : Diâmetro Hidrodinâmico

$k$ : Constante Boltzmann

$f$ : Coeficiente de atrito de partículas.

$\eta$ : Viscosidade do solvente

$T$ : Temperatura absoluta

$D$ : Coeficiente de difusão

#### IV. 4.3.2.3. Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por mobilidade electroforética em Zetasizer Nano ZS após uma diluição de 500x em uma solução aquosa de NaCl a 10 mmol L<sup>-1</sup> previamente filtrada (Millipore®, 0,45 mm). A velocidade de uma partícula sujeita a um campo elétrico é referida como a sua mobilidade electroforética. Por meio da equação de *Henry* é possível obter o potencial zeta das partículas (Equação 4).

A equação de **Henry** é:

(Equação 4)

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

$z$ : Potencial Zeta

$U_E$ : Mobilidade eletroforética

$\varepsilon$ : Constante dielétrica

$\eta$ : Viscosidade

$f(ka)$ : Função de Henry

#### IV. 4.3.2.4. Potenciometria

Os valores de pH foram obtidos em potenciômetro calibrado com tampão fosfato (pH 4,01 e pH 6,86) com sensibilidade  $\geq 99\%$ .

#### IV. 4.3.2.5. Quantificação da dapsona nas formulações

Para a quantificação da dapsona nas nanocápsulas foi retirado 200  $\mu$ L da amostra e adicionada em um balão volumétrico de 10 mL contendo uma fase móvel

composta de acetonitrila/água/ácido acético (40:59:1, v/v/v). Posteriormente, foi realizada a extração durante 30 minutos em banho de ultrassom e após, filtrando a solução e levado até o CLAE. O volume injetado foi de 100 µL com vazão de 0.7 mL/min em tempo de corrida de 10 minutos. O fármaco foi detectado no comprimento de onda de 293 nm conforme previamente validado (ORTIZ *et al.*, 2015).

#### IV. 4.3.2.6. Eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação conforme anteriormente descrito para formulações de LNC (KÜLKAMP *et al.*, 2009). Alíquotas de 400 µL das formulações contendo dapsona foram colocadas nas unidades de Ultrafree. Após centrifugação por 10 min cada ultrafiltrado foi diretamente injetado no CLAE e o fármaco quantificado conforme descrito no item de quantificação da dapsona. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas (n = 3). O cálculo da eficiência de encapsulação considerou o teor da formulação (concentração total) e a concentração de fármaco no ultrafiltrado (concentração livre) (Equação 5).

(Equação 5)

$$E = \frac{CT - CL}{CT} \times 100$$

*CT*: Concentração total de dapsona na amostra

*CL*: Concentração de dapsona livre

#### IV. 4.3.2.7. Software ImageJ

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram processadas pelo *Software ImageJ* disponível para download gratuito. O *Software ImageJ* foi usado neste estudo com a finalidade de calcular diâmetro das micelas e do centro micelar. Para cálculo do diâmetro das micelas e do centro micelar foi mantida a barra de magnificação de 0,2 µm obtida pela MET. A medida do diâmetro foi realizada medindo-se a circunferência da parte externa das micelas e para medição do centro das micelas a mesma foi realizada medindo-se a circunferência do centro das estruturas micelares (WAYNE RASBAND, 1997).

#### IV. 4.3.3 Avaliação da Atividade inibitória

##### IV. 4.3.3.1 Atividade antibacteriana

Cinco isolados clínicos (SACE 01; SACE 02; SACE 03; SACE 04 e SACE 05) de *Staphylococcus aureus* foram testados para susceptibilidade antibacteriana nesta investigação. Também foi incluída uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle. As cepas bacterianas isoladas apresentaram multirresistência à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina e penicilina G. Os isolados clínicos foram obtidos da coleção de micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os inóculos foram preparados de acordo com CLSI (M07-documentos A6, 2012). Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi utilizado o método de microdiluição em série para determinar o crescimento bacteriano (CB) (Equação 6). A análise de turbidez foi realizada em espectrofotometria com absorbância no comprimento de onda de 625 nm, onde  $T_{24}$  representa a absorbância após 24 horas de incubação e  $T_0$  representa a absorbância inicial.

(Equação 6)

$$CB: T_{24}-T_0$$

##### IV. 4.3.3.2 Atividade antifúngica

Seis cepas de três espécies de fungos filamentosos, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (ASP29; ASP30, ASP21; ASP31, ASP30 e ATCC 16888) foram testados para susceptibilidade fúngica. Todas as cepas estão depositadas na coleção de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida pelo método de microdiluição em caldo de acordo com a CLSI, (documentos M38-A2 (2008)). Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de culturas cultivadas em ágar de dextrose de Sabouraud a 32 °C e incubado durante sete dias em estufa fúngica. A análise da turbidez foi realizada em espectrofotometria com absorbância no comprimento de onda de 570/690 nm. Os ensaios foram realizados em meio RPMI-MOPS. O teste de dano celular foi realizado em MTT de acordo com o método (Equação 7) (CHIOU *et al.*, 2001).

(Equação 7)

$$\text{Dano celular (\%)} = 1 - \frac{A570 - A690 \text{ com o fármaco}}{A570 - A690 \text{ sem o fármaco}} \times 100$$

*IV. 4.3.3.3 Área aplicada inibitória mínima por ml de poço (AIM) por contagem de coloides e por concentração de quitosana por mL de poço.*

A área inibitória mínima aplicada foi calculada a partir da área superficial específica multiplicando-se pelo total de sólidos para 10 mL da formulação. Em seguida foi calculado a equivalente para 0,2 mL de formulação correspondente ao primeiro poço da microplaca, conforme equação 8.

(Equação 8)

$$1g - 50m^2$$

$$0,4g - X$$

*X: 20 m<sup>2</sup> de coloide em 10 mL de formulação*

$$10mL - 20m^2$$

$$0,2mL - X$$

*X: 0,4 m<sup>2</sup> de coloide no 1º poço da microplaca*

Para cálculo da área aplicada inibitória mínima por ml de poço (AIM) por contagem de coloides propussemos a seguinte equação 9. Para isso, levamos em consideração a densidade de partículas de 1g/cm<sup>3</sup>.

(Equação 9).

$$AIM = TS \times ASE \times \frac{VA}{VT}$$

Onde:

TS: É o total de sólidos em g da formulação.

ASE: Área superficial específica em m<sup>2</sup>/g.

VA: Volume administrado da formulação.

VT: Volume total da formulação final.

Para cálculo da concentração de quitosana por mL de poço a administrada foi calculada a partir da concentração de quitosana por  $\mu\text{g/ml}$  multiplicando-se pela concentração em 0,2 ml de formulação, a qual corresponde ao primeiro poço da microplaca, conforme equação 10.

(Equação 10)

$$1\text{ml} - 10\mu\text{g}$$

$$0,2\text{ml} - X$$

$X: 2 \mu\text{g/ml}$  de quitosana no 1° poço da microplaca

#### **IV. 4.3.4 Obtenção de pós de nanocápsulas por aspersão em *Spray-dryer***

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico foram secas em Mini Spray-Dryer. Cada dispersão aquosa de nanocápsulas de núcleo lipídico foi adicionada com leucina (1% ou 2%, m/v) ou lactose (2%, 3%, 5% ou 10%, m/v) como adjuvantes de secagens. Cada dispersão foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos antes da aspersão. Os seguintes parâmetros de aspersão foram utilizados: temperatura de entrada 120 °C, temperatura de saída 62°C, Pump 15%, Nozzle 1 e aspirador 100%. Após aspersão os pós foram removidos do frasco coletor e armazenados em dessecador.

#### **IV. 4.3.5 Caracterização dos pós de nanocápsulas de núcleo lipídico**

##### *IV. 4.3.5.1 Rendimento dos pós*

O cálculo de rendimento foi determinado pela relação percentual (%) entre as massas experimental e teórica sendo a primeira medida em balança analítica e a segunda pela soma das massas dos materiais, componentes das nanocápsulas de núcleo lipídico adicionados nas respectivas massas de adjuvante empregadas para cada pó.

##### *IV. 4.3.5.2. Desaglomeração dos pós por difração de laser*

Cada pó foi adicionado diretamente no compartimento da unidade de análise por via úmida do Mastersizer® 2000 e em tempos programados de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Após, foram registrados os perfis de diâmetro entre 400 nm e 2 mm para assim determinar a desaglomeração das amostras.

#### *IV. 4.3.5.3. Perda por dessecação*

Para determinar a perda por dessecação dos pós obtidos por aspersão 1 g de cada pó foi pesado e analisado em temperatura de 105°C por 1 minuto de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5.ed. 2010).

#### *IV. 4.3.5.4. Determinação de teor de dapsona nos pós obtidos por aspersão*

Os pós de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona foram pesados (12 mg) e dispersos em um balão volumétrico de 10 ml contendo uma mistura de acetoneitrila/água/ácido acético (40:59:1, v/v/v). Posteriormente foi realizada a extração do fármaco conforme descrito no item da quantificação da dapsona.

#### **IV. 4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para análise elementar das nanocápsulas de núcleo lipídico foram adicionadas alíquotas de 100 e 200 µL das amostras (LNC; LNC-CS; DAP-LNC e DAP-LNC-CS) sobre fitas de carbono. Após evaporação da água em temperatura ambiente cada amostra foi analisada sem metalização por microscopia eletrônica de varredura no Laboratório Regional de Nanotecnologia (LRNANO) o qual é vinculado ao Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As amostras de pós de nanocápsulas de núcleo lipídico obtidos por aspersão foram analisados quanto a sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura em 10kV. Estas amostras foram metalizadas com ouro para assim serem analisadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **IV. 4.3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para análise morfológica das nanocápsulas de núcleo lipídico as suspensões (100 µL) foram diluídas em uma proporção de 1:10 em água (v/v) sendo cada amostra diluída adicionada (20µL) sobre *grids* de cobre (400 mesh) revestidas com formavar/carbono. Um contraste negativo (acetato de uranila a 2% em água) foi adicionado sobre cada *grid*, e, então mantidos por 24 horas em um dessecador à vácuo. As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul operando em 80Kv.



#### IV. 4.3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas em software GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, EUA) utilizando-se o teste *t* de *Student* com um nível de significância de  $P < 0,05$ .

Para comparação das diferenças significativas das concentrações inibitórias mínimas entre cepas e formulações foi realizado uma análise estatística ANOVA usando o método de *tukey* por meio de software Minitab (Versão 16.1.0, USA), considerando um valor significativo de  $P (< 0,05)$ .

A análise estatística das medições dos tempos de desaglomeração das amostras de pós por difração de laser foi efetuada em software Statistical Analysis System, (SAS, EUA) empregando-se o teste Anova Modelo fixo com nível de significância de  $P < 0,05$ .



**V.RESULTADOS**

---



## V. 5.1 DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO DISPERSAS EM ÁGUA

### V. 5.1.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas ou não com quitosana

As nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas ou não com quitosana foram preparadas de acordo com a metodologia previamente descrita por Bender e colaboradores (2012). O aspecto macroscópico das formulações antes do revestimento (LNC) ou após o revestimento com quitosana (LNC-CS) foi semelhante, apresentando-se como líquidos homogêneos leitosos esbranquiçados com efeito Tyndall.

A distribuição do tamanho das nanocápsulas de núcleo lipídico foi determinada por difração de laser e por espectroscopia de correlação de fótons (PCS). O diâmetro médio  $D_{[4,3]}$  variou de 126 a 130 nm entre as formulações testadas (Tabela 2). A média dos diâmetros analisados por PCS foi de 114 a 125 nm enquanto que diâmetros médios das partículas calculados pelo algoritmo de CONTIN variaram de 131 a 150 nm para as formulações com ou sem fármaco e revestidas ou não com quitosana (LNC; LNC-CS; DAP-LNC; DAP-LNC-CS). A largura a meia altura da curva de distribuição de diâmetros variou entre de 50 a 59 nm (Tabela 2). Os índices de polidispersão (PDI) foram de 0,117 a 0,171 para as formulações desenvolvidas neste estudo (Tabela 2).

O potencial zeta foi negativo para as formulações revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 (LNC e DAP-LNC) e positivo para formulações revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana (LNC-CS e DAP-LNC-CS) (Tabela 3). O pH variou entre  $4,15 \pm 0,16$  e  $4,57 \pm 0,46$  para as formulações analisadas (Tabela 3). A eficiência de encapsulação encontrada para a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestida com fosfatidilcolina e polissorbato 80 e para a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana foram superiores a 80%, conforme descritas na tabela 3.

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas sem fármaco ou com a dapsona revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 ou com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana apresentaram distribuição unimodal tanto por difração de laser (Figura 4) quanto por espectroscopia de correlação de fótons (Figura 5). Adicionalmente, o gráfico radar plotado a partir dos dados de difração de laser mostram perfis característicos para formulações unimodais nanoscópicas

(Figura 6). Todas as formulações analisadas pelo gráfico radar apresentaram perfis sobreponíveis por volume e por número considerando os diâmetros: diâmetro médio  $D_{[4,3]}$ ;  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$ , e  $d(0,9)$  os quais correspondem àqueles obtidos nos percentis 10%, 50% e 90% das curvas de distribuição cumulativa de tamanhos com base no volume e no número de partículas.

Tabela 2: Diâmetro médio volumétrico  $D_{[4,3]}$ , diâmetro médio hidrodinâmico, calculado pelo método de Cumulants ( $d_{z-ave}$ ) e pelo algoritmo de CONTIN ( $d_h$ ), largura a meia altura da curva de distribuição de diâmetros (FWHM), calculada pelo algoritmo de CONTIN e índice de polidispersão (PDI) das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.

Amostras (n=3)	$D_{[4,3]}$ (nm)	$d_{z-ave}$ (nm)	$d_h$ (nm)	FWHM (nm)	PDI
LNC	127±2	118±1	134±1	50±3	0,121±0,001
LNC-CS	129±4	125±8	150±10	59±5	0,171±0,041
DAP-LNC	126±2	118±3	135±3	50±3	0,117±0,008
DAP-LNC-CS	130±5	114±4	131±7	52±7	0,171±0,047

LNC, nanocápsulas de núcleo lipídico; LNC-CS, nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana; DAP-LNC, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e DAP-LNC-CS: nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestida com quitosana.

Tabela 3: Teor de dapsona na formulação, eficiência de encapsulação (EE), potencial zeta e pH das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.

Amostras (n=3)	Teor de dapsona (mg/ml)	EE (%)	Potencial zeta (mV)	pH
LNC	-	-	- 15±3	4,52±0,15
LNC-CS	-	-	+ 23±4	4,23±0,14
DAP-LNC	1,024±0,01	84±0,6	- 13±2	4,57±0,46
DAP-LNC-CS	0,880±5,13	82±0,7	+ 21±6	4,15±0,16

LNC, nanocápsulas de núcleo lipídico; LNC-CS, nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana; DAP-LNC, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e DAP-LNC-CS: nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestida com quitosana.

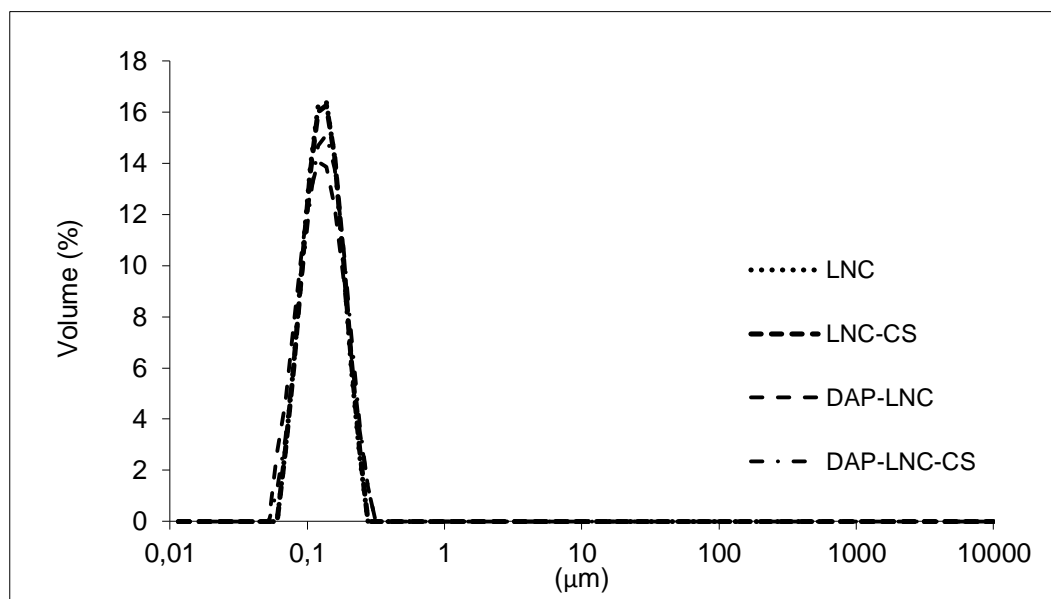


Figura 4: Curva de distribuição de diâmetros determinada por difração de laser.

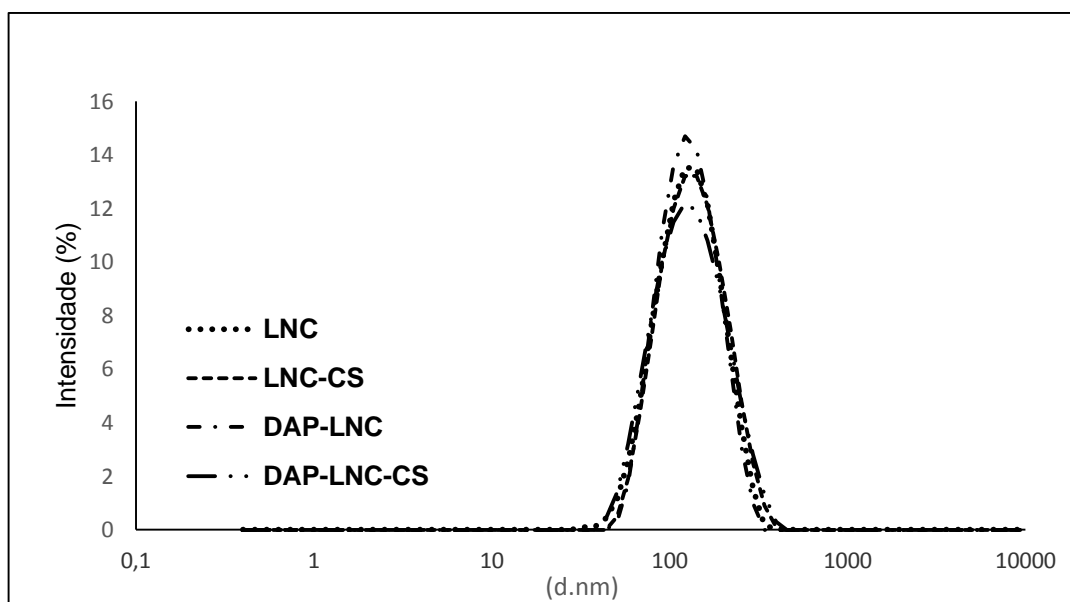


Figura 5: Curva de distribuição de diâmetros determinada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

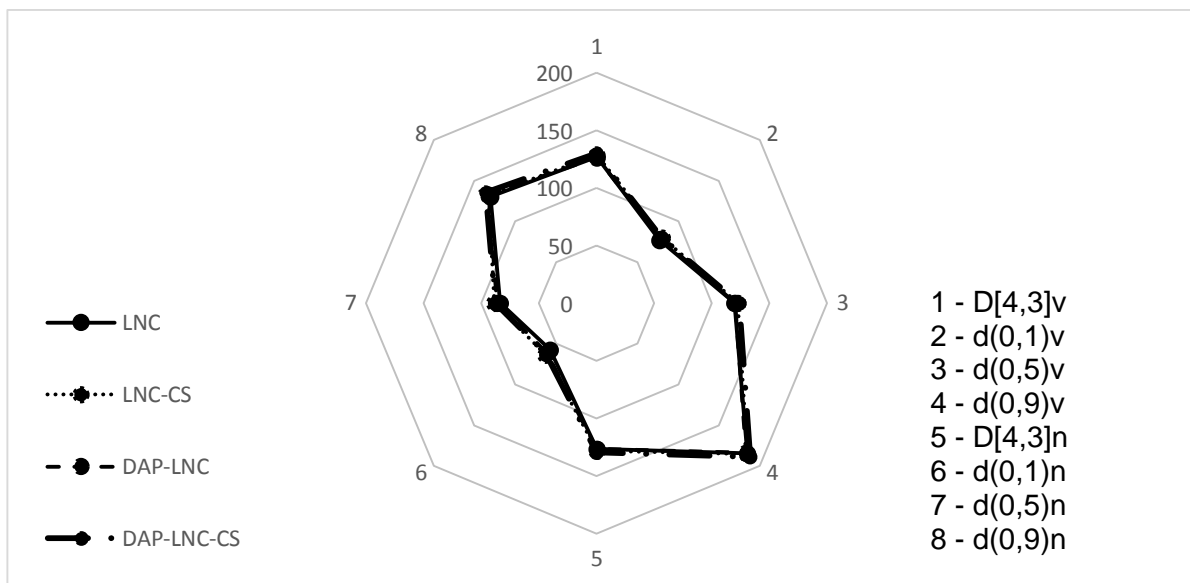


Figura 6: Gráfico de radar plotado a partir dos dados de difração de laser das amostras LNC, LNC-CS, DAP-LNC e DAP-LNC-CS. [eixos: 1 corresponde ao diâmetro médio por volume das partículas,  $D[4,3]v$ ; 2 é o diâmetro em volume no percentil de 10% da curva de distribuição,  $d(0,1)v$ ; 3 é o diâmetro em volume no percentil de 50% da curva de distribuição,  $d(0,5)v$ ; 4 é o diâmetro em volume no percentil de 90% da curva de distribuição,  $d(0,9)v$ ; 5 corresponde ao diâmetro médio por número das partículas,  $D[4,3]n$ ; 6 representa o diâmetro por número no percentil de 10% da curva de distribuição,  $d(0,1)n$ ; 7 é o diâmetro por número no percentil de 50% da curva de distribuição,  $d(0,5)n$  e 8 corresponde ao diâmetro em número no percentil de 90% da curva de distribuição,  $d(0,9)n$ ].

### V. 5.1.2. Análises de microscopia eletrônica e microanálise

Através da microanálise química elementar verificamos a presença de carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P) e alumínio (Al) nas amostras sobre os suportes. A detecção de alumínio se deu em virtude dos suportes de análises possuem alumínio em sua composição. As amostras de LNC e DAP-LNC apresentaram a composição química de (C), (O), (P) e (Al). Por outro lado as amostras de LNC-CS e DAP-LNC-CS apresentaram (C), (O), (N) e (P) (Figura 7).

A análise de composição elementar semi-quantitativa mostrou a presença de 73,04% (C), 22,33 % (O), 2,40 % (P) e 2,23 % (Al) para a amostra de LNC. Para a formulação de LNC-CS os valores foram de 74,98 % (C), 19,26 % (O), 4,96% (N) e 0,80 % (P). A amostra de DAP-LNC os achados foram de 69,21 % (C), 28,97 % (O), 1,02 % (Al) e 0,79% (P). Adicionalmente, para a amostra de DAP-LNC-CS os valores encontrados foram de 69,08 % (C), 27,27 % (O), 2,75 % (N) e 0,89 % (P). O presença do nitrogênio (N) não foi detectado no gráfico das formulações LNC-CS e DAP-LNC-CS, mas sim na tabela gerada pelo equipamento que se encontra em anexo.

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET) verificamos que as nanocápsulas de núcleo lipídico possuem em sua grande maioria formato esférico (Figura 8).



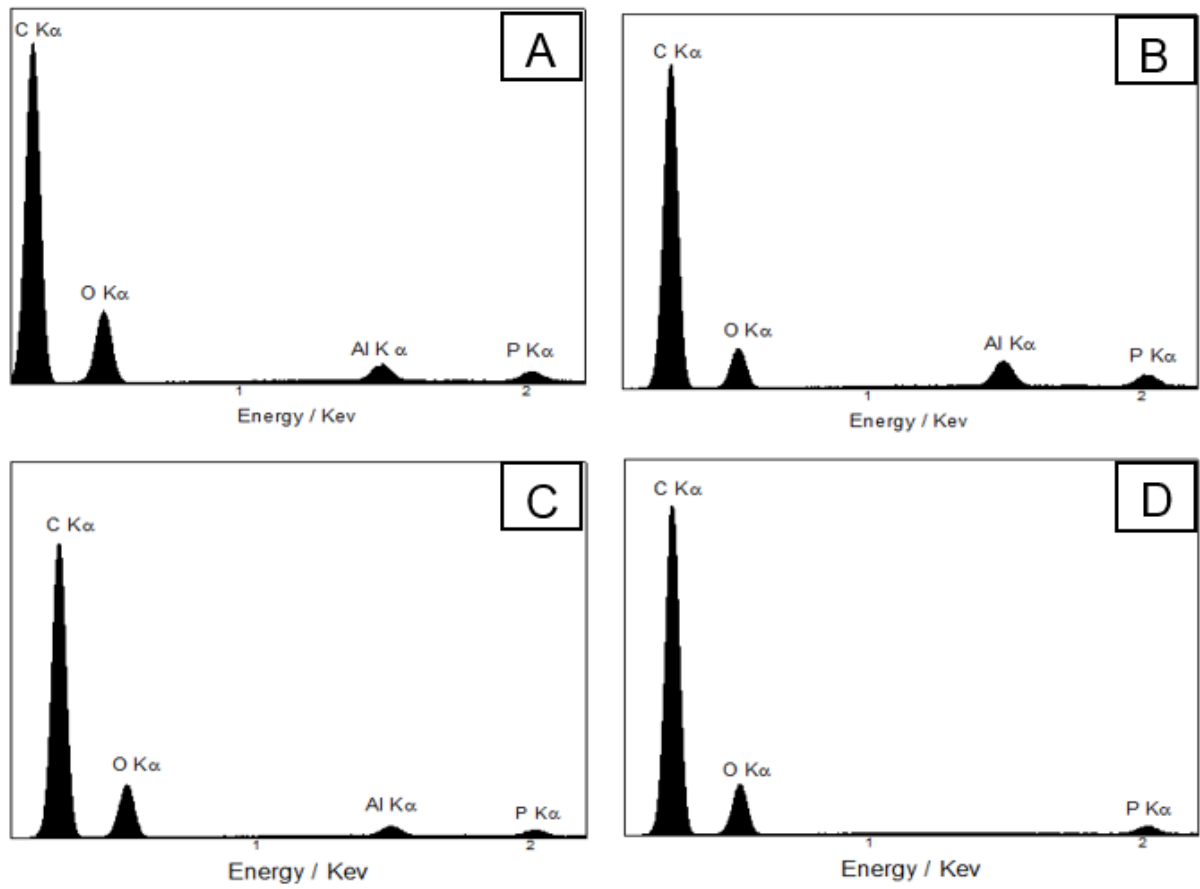


Figura 7: Microanálise química elemental: a) LNC; b) LNC-CS; c) DAP-LNC e d) DAP-LNC-CS.

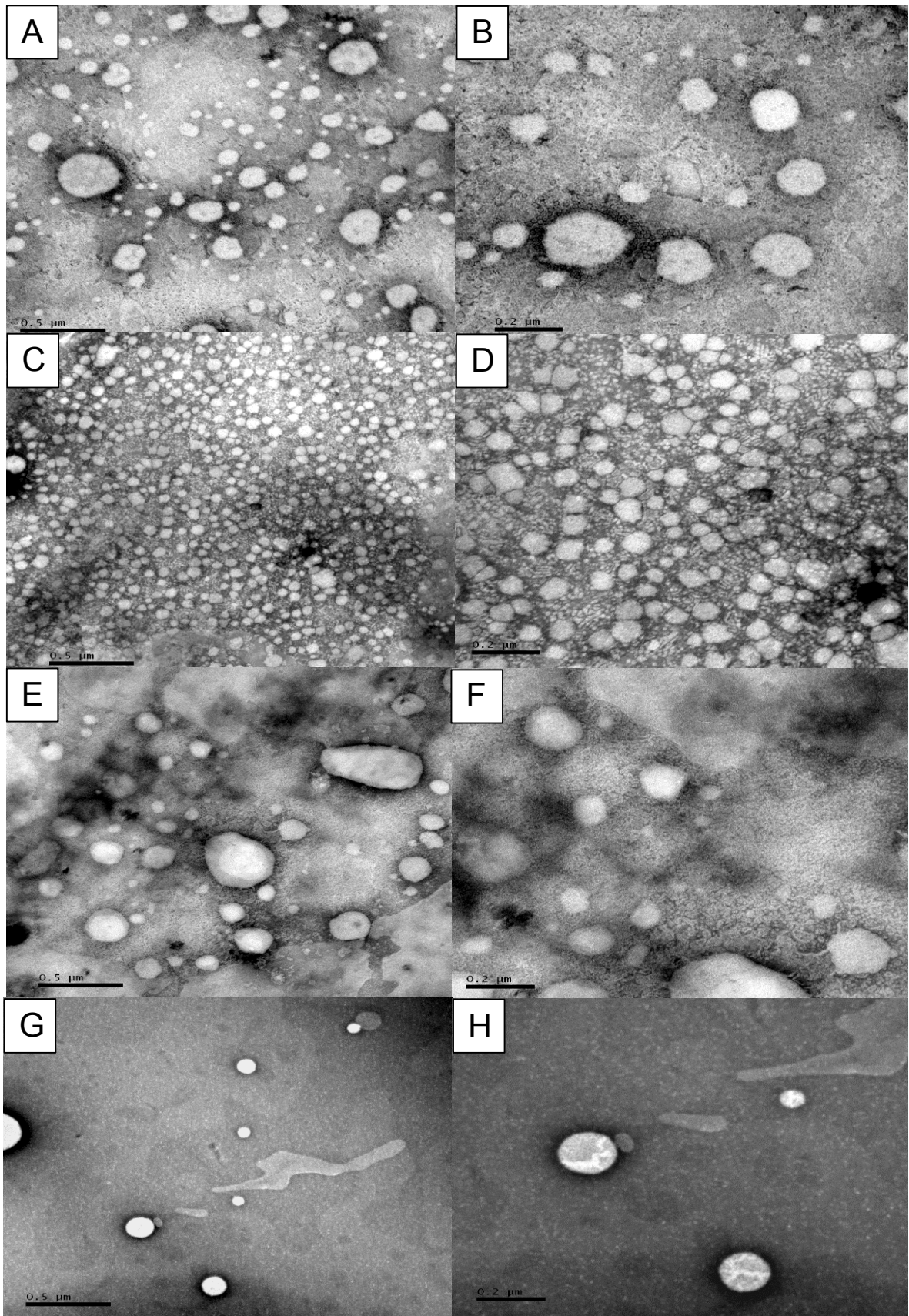


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão (MET): a: LNC (0,5μm), b: LNC (0,2μm); c: LNC-CS (0,5μm), d: LNC-CS (0,2μm); e: DAP-LNC (0,5μm), f: DAP-LNC (0,2μm); g: DAP-LNC-CS (0,5μm) e h: DAP-LNC-CS (0,2μm).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (figura 9) mostraram que as nanocápsulas de núcleo lipídico são rodeadas por estruturas micelares esféricas e estas estruturas apresentam-se na ordem de 4 camadas revestindo as nanocápsulas, constituindo a coroa hidrofílica. O cálculo da distribuição de diâmetros dessas estruturas na coroa hidrofílica levou à determinação do diâmetro médio de  $18\pm 3$  nm (figura 10a). A análise da fotomicrografia ampliada mostra estruturas esféricas (figura 10b) com morfologia diversa cujos os modelos esquemáticos podem ser visualizados na figura 10c. Ampliações das imagens de microscopia eletrônica mostram uma sequência de transformações de micelas esféricas em cilíndricas (figura 11) sendo que na figura 11a as estruturas apresentam se esféricas; na figura 11b ocorre uma pequena deformação micelar; na figura 11c pode-se notar uma grande deformação micelar e na figura 11d observa-se uma forma cilíndrica de micela. Para diferenciar as estruturas na coroa hidrofílica a frequência de diâmetro do centro das estruturas micelares foi calculado. A curva de distribuição de diâmetros do centro das micelas (figura 12a) mostra-se bimodal com média e desvio padrão em  $8\pm 2$  nm. Adicionalmente, cada modo dessa distribuição analisado separadamente mostra média de diâmetro e desvio padrão do centro da estrutura em  $6\pm 1$  nm (figura 12b) e em  $9\pm 2$  nm (figura 12c). Com base na imagem obtida que demonstra como as micelas se organizam na coroa hidrofílica das nanocápsulas e no espaço entre as coroas propusemos um modelo representativo das LNC (figura 13).

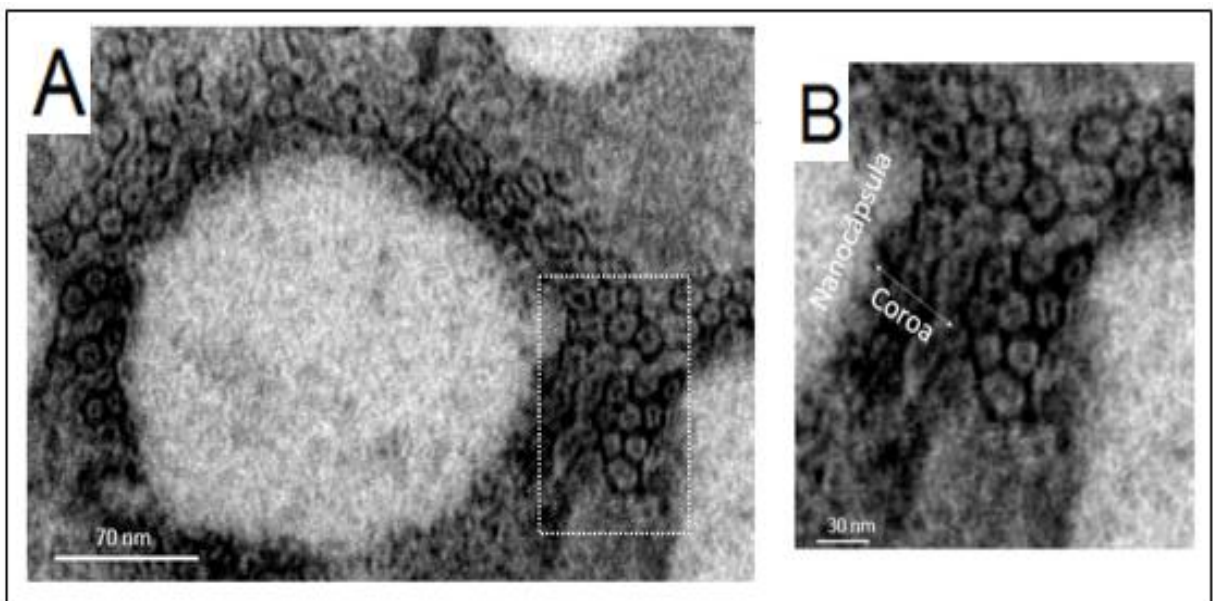


Figura 9. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e b) ampliação da imagem da coroa hidrofílica das LNC.

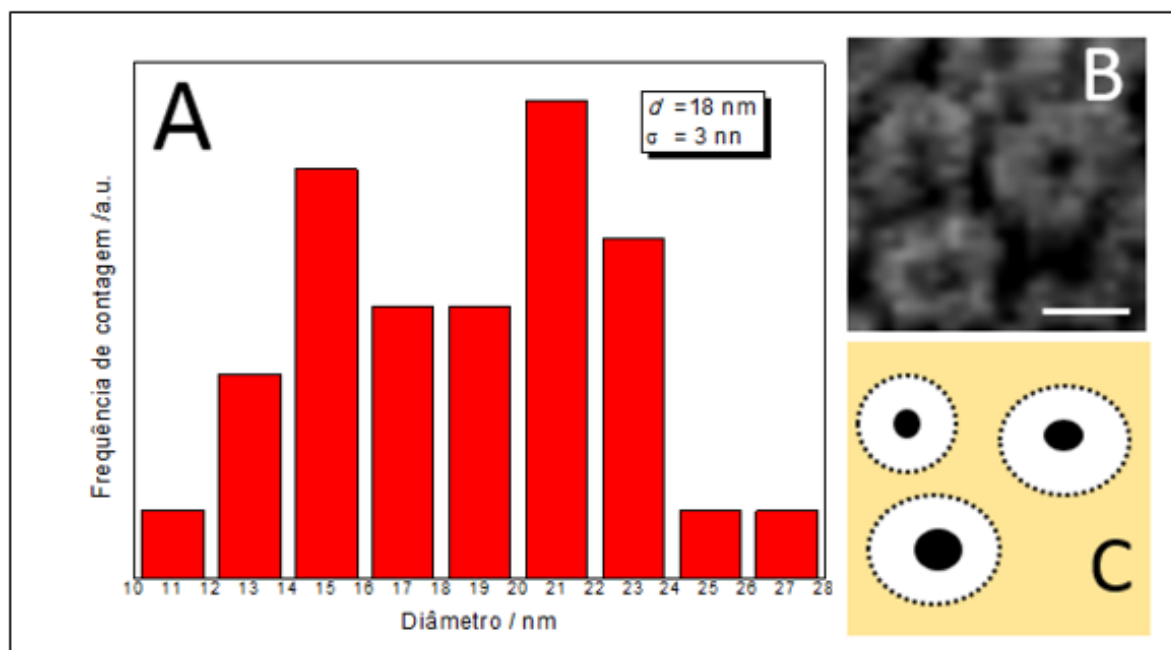


Figura 10. a) Distribuição de diâmetros das estruturas micelares da coroa hidrofílica das LNC, onde ( $d$ ) é o diâmetro médio das estruturas e ( $\sigma$ ) é o desvio padrão; b) Ampliação da imagem de microscopia eletrônica das estruturas micelares. A linha de magnificação corresponde a 10 nm; c) Modelo das estruturas micelares.

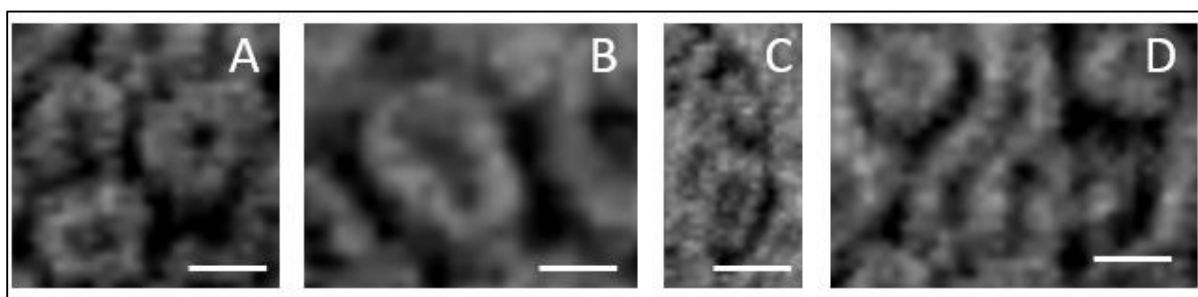


Figura 11. Ampliações de imagens de microscopia eletrônica mostrando a sequência de transformação de micelas esféricas em cilíndricas: a) micelas esféricas; b) micelas com pequena deformação; c) micelas com grande deformação e d) forma cilíndrica micelar. A linha de magnificação corresponde a 10 nm.

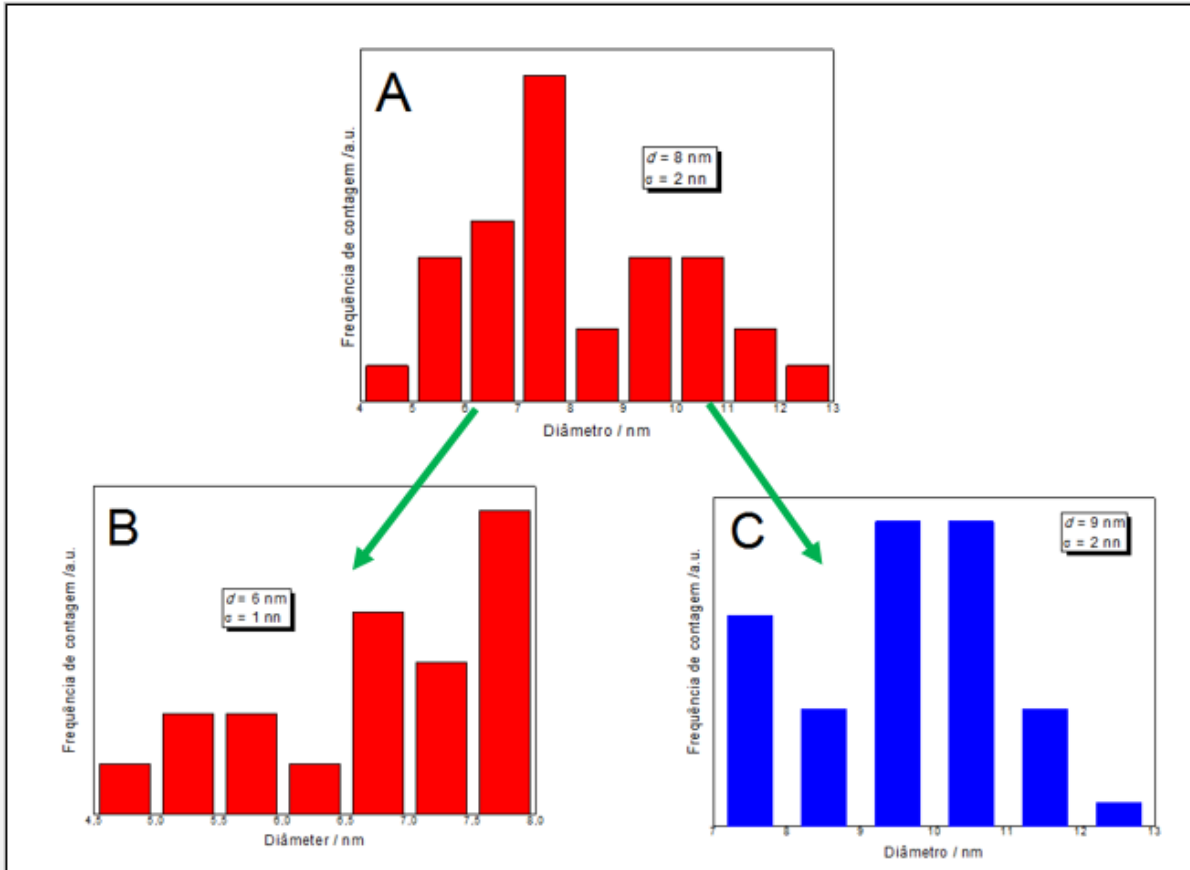


Figura 12. Histogramas de frequência de diâmetros do centro das estruturas micelares: a) do centro da estrutura micelar; b) do centro das estruturas micelares no intervalo 4,5 a 8,0 nm e c) do centro das estruturas micelares no intervalo de 7,0 a 13,0 nm, onde ( $\sigma$ ) é o diâmetro do centro das estruturas micelares e ( $\sigma$ ) é o desvio padrão.

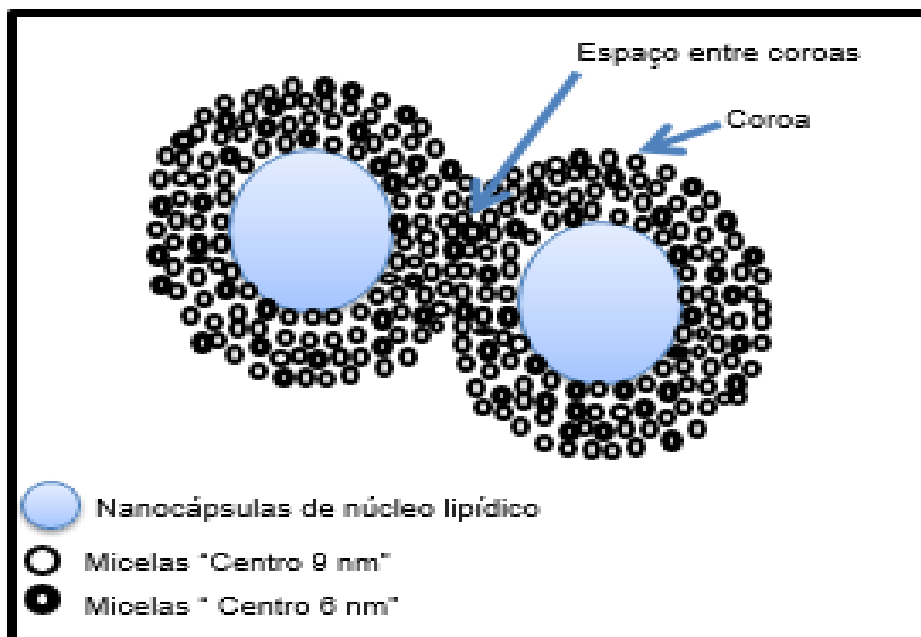


Figura 13. Modelo representativo das nanocápsulas de núcleo lipídico, destacando a coroa hidrofílica constituída de estruturas micelares.

## V. 5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A concentração inibitória mínima (MIC) de todas as cepas de *Stafilococcus aureus multirresistentes* incluindo a cepa padronizada ATCC 25923 apresentou os mesmos perfis de susceptibilidade antibacteriana para a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com fosfatidilcolina, polissorbatato 80 e quitosana (DAP-LNC-CS) (tabela 4). A formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestida com fosfatidilcolina e polissorbatato 80 (DAP-LNC) apresentou perfil de susceptibilidade antibacteriana de 127 a 510 µg/ml para a cepa de *S. aureus* (tabela 4). Na formulação contendo apenas dapsona dispersa polissorbatato 80 (DAP) a concentração inibitória mínima variou de 221 a 443 µg/ml para as cepas de *S. aureus* conforme tabela 4.

Quando analisados os perfis de atividades frente às concentrações de quitosana por mL de poço verificamos que todos os isolados bacterianos incluindo a cepa padronizada ATCC apresentou perfil de resistência na concentração de 0,250 µg/ml de quitosana para as formulações de LNC-CS e DAP-LNC-CS (tabela 4). Quando comparamos ambas as formulações por concentração de quitosana podemos notar que resultados foram similares entre si (tabela 4).

As formulações de LNC-CS e DAP-LNC-CS apresentaram perfis semelhantes antibacterianos quando analisadas por área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por mL de poço (tabela 5). Os resultados encontrados foram de 0,048 a 0,050 m<sup>2</sup>/ml de partículas para todas as cepas testadas *in vitro*. A formulação de LNC revestida com fosfatilcolina e polissorbatato 80, não demonstrou atividade antibacteriana para qualquer das cepas testadas (tabela 5). Na formulação contendo dapsona nanoencapsulada e revestida com fosfatilcolina e polissorbatato 80 (DAP-LNC) podemos observar um grau de inibição variando de 0,051 a 0,205 m<sup>2</sup>/ml de partículas (tabela 5). Por outro lado para as demais cepas multirresistentes não foi observado qualquer grau de inibição antibacteriana, ou seja, houve crescimento microbiano das bactérias testadas neste estudo conforme descritas na tabela 5.

De acordo com a análise estatística realizada pelo teste de *tukey* ( $p < 0,05$ ) a formulação DAP-LNC-CS obteve melhor atividade quando comparada com as formulações DAP e DAP-LNC por concentração inibitória mínima de dapsona em µg por ml de poço. Para as formulações LNC-CS e DAP-LNC-CS não houve diferença significativa quando analisadas por concentração inibitória mínima de quitosana e por área aplicada inibitória mínima em µg por ml de poço.

Tabela 4: Perfil das concentrações inibitórias mínimas das bactérias.

Bactérias	DAP		LNC-CS		DAP-LNC		DAP-LNC-CS	
	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>
<i>S. aureus</i> ATCC25923)	221 <sup>C</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	127 <sup>D</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE01)	na <sup>F</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	510 <sup>A</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE02)	na <sup>F</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	na <sup>F</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE03)	na <sup>F</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	na <sup>F</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE04)	443 <sup>B</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	na <sup>F</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE05)	na <sup>F</sup>	-	-	0,250 <sup>A</sup>	na <sup>F</sup>	-	109 <sup>E</sup>	0,250 <sup>A</sup>

Dapsona livre preparada com dapsona e polissorbato 80 (DAP); nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana (LNC-CS); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC) e; nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestidas com quitosana (DAP-LNC-CS).

MIC<sub>D</sub>: Concentração inibitória mínima de dapsona em µg por ml de poço.

MIC<sub>Q</sub>: Concentração inibitória mínima de quitosana em µg por ml de poço.

na: não houve atividade.

(-): sem componentes.

Diferentes letras acima das concentrações inibitórias mínimas representam uma estatística significativamente diferente considerando P (< 0.05) teste de turkey.

Tabela 5: Área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por ml de poço (AIM).

Bactérias	LNC	LNC-CS	DAP-LNC	DAP-LNC-CS
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	0,051 <sup>B</sup>	0,050 <sup>B</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE01)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	0,205 <sup>A</sup>	0,050 <sup>B</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE02)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	na <sup>C</sup>	0,050 <sup>B</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE03)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	na <sup>C</sup>	0,050 <sup>B</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE04)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	na <sup>C</sup>	0,050 <sup>B</sup>
<i>S. aureus</i> (SACE05)	na <sup>C</sup>	0,048 <sup>B</sup>	na <sup>C</sup>	0,050 <sup>B</sup>

Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana (LNC-CS); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC) e; nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestidas com quitosana (DAP-LNC-CS).

na: não houve atividade

Diferentes letras acima das Áreas inibitórias mínimas representam uma estatística significativamente diferente considerando P (< 0.05) teste de turkey.

### V. 5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com fosfatidilcolina, polissorbaro 80 e quitosana (DAP-LNC-CS) apresentaram concentração inibitória mínima de 7 a 109 µg/ml com dano celular de 60 a 75% para as cepas de *Aspergillus niger* (tabela 6). Para as cepas de *Aspergillus*

*flavus* o MIC variou de 54 a 219 µg/ml com dano celular de 65 a 85% (tabela 6). Para as cepas de *Aspergillus fumigatus* o MIC observado foi de 54 a 439 µg/ml com grau de dano celular variando de 59% a 83% (tabela 6). A formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com fosfatidilcolina e polissorbaro 80 (DAP-LNC) exibiu MIC apenas para a cepa de *Aspergillus fumigatus* conforme descritas na tabela 6.

Para a dispersão de dapsona em polissorbato 80 (DAP) foi observado também a concentração inibitória mínima foram ambas para as cepas de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus Flavus* (tabela 6). As cepas de *Aspergillus niger* exibiram um MIC de 13 a 110 µg/ml com um dano celular que variou de 74% e 75% (tabela 6). Os outros isolados (ASP30-*fumigatus* e ASP31-*flavus*) não apresentaram qualquer grau de inibição nestas concentrações testadas *in vitro* (tabela 6).

As concentrações inibitórias mínimas de quitosana para as cepas fúngicas de *Aspergillus flavus* variaram de 0,500 a 0,062 µg/ml com dano celular de 64% para formulação de LNC-CS (tabela 6). Por sua vez, para as cepas de *Aspergillus niger* as concentrações inibitórias mínimas de quitosana foram de 0,007 a 1 µg/ml com dano celular de 70% a 72% (tabela 6). Paralelamente, a formulação DAP-LNC-CS apresentou concentrações inibitórias mínimas de quitosana que variou de 0,125 a 1 µg/ml com dano celular variando de 59% a 83% para as cepas de *Aspergillus fumigatus* (tabela 6). Para a cepas dos *Aspergillus flavus* as concentrações inibitórias mínimas de quitosana foram de 0,125 a 0,500 µg/ml com dano celular de 65% a 85% (tabela 6). Já para as cepas dos *Aspergillus niger* o MIC observado variou de 0,015 a 0,025 µg/ml de quitosana com dano celular variando de 60% a 75% (tabela 6).

As áreas aplicadas inibitórias mínimas de nanocápsulas por ml de poço para a formulação de DAP-LNC-CS variou de 0,025 a 0,202 m<sup>2</sup>/ml para as cepas de *Aspergillus fumigatus* as quais apresentaram um dano celular de 59% a 83% (tabela 7). As AIM de nanocápsulas por ml de poço para as cepas de *Aspergillus flavus* foram de 0,025 a 0,101 m<sup>2</sup>/ml com dano celular variando de 65% a 85% (tabela 7). No entanto, as AIM de nanocápsulas por ml de poço variou de 0,003 a 0,050 m<sup>2</sup>/ml para as cepas de *Aspergillus niger* com um grau de dano celular que foi de 60% a 75% (tabela 7). A formulação contendo dapsona nanoencapsulada e revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 demonstrou AIM de nanocápsula por ml de poço apenas para a cepa de *Aspergillus flavus* conforme tabela 7.



As nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com fosfatidilcolina e polissorbat 80 (LNC) não exibiram atividades inibitórias. Os resultados da formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com fosfatidilcolina, polissorbat 80 e quitosana (LNC-CS) não apresentaram atividades fúngicas para as cepas de *Aspergillus fumigatus* (tabela 7). Paralelamente, para as cepas de *Aspergillus flavus* e *niger* as AIM variaram de 0,001 a 0,194 m<sup>2</sup>/ml de partículas por mL (tabela 7).

Segundo a análise estatística realizada pelo teste de *tukey* ( $p < 0,05$ ) a formulação DAP-LNC-CS obteve melhor atividade quando comparada com as formulações DAP e DAP-LNC por concentração inibitória mínima de dapsona em µg por ml de poço com exceção das espécies de *Aspergillus niger*. Quando analisada por concentração inibitória mínima de quitosana e por área aplicada inibitória mínima em µg por ml de poço a formulação DAP-LNC-CS apresentou melhores resultados segundo a análise estatística para inibir o crescimento fúngico, com exceção da cepa de *Aspergillus niger* ASP06.

Tabela 6: Perfil das concentrações inibitórias mínimas dos fungos.

Fungos	DAP		LNC-CS		DAP-LNC		DAP-LNC-CS	
	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>	MIC <sub>D</sub>	MIC <sub>Q</sub>
<i>A. fumigatus</i> (ASP29)	443 [73%] <sup>B</sup>	-	-	na <sup>C</sup>	na <sup>H</sup>	-	54 [59%] <sup>F</sup>	0,125 [59%] <sup>C</sup>
<i>A. fumigatus</i> (ASP30)	na <sup>H</sup>	-	-	na <sup>C</sup>	na <sup>H</sup>	-	439 [83%] <sup>C</sup>	1 [83%] <sup>A</sup>
<i>A. flavus</i> (ASP21)	443 [83%] <sup>B</sup>	-	-	0,500 [64%] <sup>B</sup>	na <sup>H</sup>	-	54 [65%] <sup>F</sup>	0,125 [65%] <sup>C</sup>
<i>A. flavus</i> (ASP31)	na <sup>H</sup>	-	-	0,062 [64%] <sup>C</sup>	510 [82%] <sup>A</sup>	-	219 [85%] <sup>D</sup>	0,500 [85%] <sup>B</sup>
<i>A. niger</i> (ATCC 16888)	110 [75%] <sup>E</sup>	-	-	1 [70%] <sup>A</sup>	na <sup>H</sup>	-	109 [60%] <sup>E</sup>	0,025 [60%] <sup>C</sup>
<i>A. niger</i> (ASP06)	13 [74%] <sup>G</sup>	-	-	0,007 [72%] <sup>C</sup>	na <sup>H</sup>	-	7 [75%] <sup>G</sup>	0,015 [75%] <sup>C</sup>

Dapsona livre preparada com dapsona e polissorbat 80 (DAP); nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana (LNC-CS); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC) e; nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona resvestidas com quitosana (DAP-LNC-CS).

MIC<sub>D</sub>: Concentração inibitória mínima de dapsona em µg por ml de poço.

MIC<sub>Q</sub>: Concentração inibitória mínima de quitosana em µg por ml de poço.

[%]: Dano celular

na: não houve atividade

-:sem componentes

Diferentes letras acima das concentrações inibitórias mínimas representam uma estatística significativamente diferente considerando P (< 0.05) teste de turkey.

Tabela 7: Área aplicada inibitória mínima de nanocápsulas por ml de poço (AIM).

Fungos	LNC	LNC-CS	DAP-LNC	DAP-LNC-CS
<i>A. fumigatus</i> (ASP29)	na <sup>G</sup>	na <sup>G</sup>	na <sup>G</sup>	0,025 [59%] <sup>E</sup>
<i>A. fumigatus</i> (ASP30)	na <sup>G</sup>	na <sup>G</sup>	na <sup>G</sup>	0,202 [83%] <sup>A</sup>
<i>A. flavus</i> (ASP21)	na <sup>G</sup>	0,097 [64%] <sup>C</sup>	na <sup>G</sup>	0,025 [65%] <sup>E</sup>
<i>A. flavus</i> (ASP31)	na <sup>G</sup>	0,012 [64%] <sup>F</sup>	0,205 [82%] <sup>A</sup>	0,101 [85%] <sup>C</sup>
<i>A. niger</i> (ATCC 16888)	na <sup>G</sup>	0,194 [70%] <sup>B</sup>	na <sup>G</sup>	0,050 [60%] <sup>D</sup>
<i>A. niger</i> (ASP06)	na <sup>G</sup>	0,001 [72%] <sup>J</sup>	na <sup>G</sup>	0,003 [75%] <sup>E</sup>

Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana (LNC-CS); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC); nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona (DAP-LNC) e; nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona revestidas com quitosana (DAP-LNC-CS).

[%]: Dano celular

na: não houve atividade

Diferentes letras acima das Áreas inibitórias mínimas representam uma estatística significativamente diferente considerando P (< 0.05) teste de turkey.

## V. 5.4 DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO NA FORMA DE PÓS

### V. 5.4.1 Pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana

Após o desenvolvimento e caracterização das suspensões as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana estas foram submetidas ao processo de secagem tendo em vista adquirir um produto pulverulento. Para isso as formulações foram produzidas no volume final de 50 ml.

A análise macroscópica das nanocápsulas adquiridas via secagem por aspersão evidenciou-se tratar de um pó fino e branco, com aspecto pulverulento formando pequenas partículas. Os rendimentos das formulações secas com suas respectivas concentrações de adjuvantes de secagem testados variou de 48±3% a 69±2% (tabela 8). A perda por dessecação dos pós secos ficou abaixo de 2% (tabela 10).

O teor da dapsona foi de 80,7±3% a 94,9±1% quando analisadas por mg/mL nas formulações de nanocápsulas (tabela 8). Por meio do doseamento da dapsona nos pós podemos corroborar que não houve muitas perdas em virtude do processo de secagem.

O diâmetro médio das partículas secas após 30 minutos de desaglomeração em água variou de 429±1 a 715±3 nm para as formulações secas com leucina (tabela

8). Para as formulações secas nas concentrações de lactose o diâmetro médio observado foi de  $321\pm 3$  a  $732\pm 4$  nm (tabela 8).

O gráfico da figura 14 ilustra como foi a desaglomeração de todas as formulações desenvolvidas e analisadas durante os 30 minutos empregados além disso, foi verificado também a área superficial específica nestes tempos. Por meio dos gráficos de área específica (figura 15) podemos correlacionar tempo x área superficial específica, ou seja, a medida que o diâmetro médio vai diminuindo a área superficial tende a aumentar, ou versa.

Na figura 16 podemos observar por meio de gráficos radar o comportamento das partículas frente ao processo de desaglomeração em água por volume e por número nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para as formulações de nanocápsulas secas com leucina ou lactose.

Tabela 8: Rendimento, perda por dessecação, desaglomeração e teor das formulações contendo leucina e lactose com seus adjuvantes de secagem.

Formulações (n=3)	Rendimento (%)	PD (%)*	D[4,3] (nm)**	D[4,3] (nm)***	Teor DAP (mg/ml) (%)
DAP-LNC-CS 1% (leucina)	$58\pm 1$	$1,33\pm 0,2$	$715\pm 3$	$430\pm 1$	$94,9\pm 1$
DAP-LNC-CS 2% (leucina)	$61,3\pm 1$	$1,33\pm 0,2$	$483\pm 6$	$429\pm 1$	$92,4\pm 1$
DAP-LNC-CS 2% (lactose)	nd	nd	nd	nd	nd
DAP-LNC-CS 3% (lactose)	$48\pm 3$	$1,50\pm 0,5$	$732\pm 4$	$527\pm 2$	$82,9\pm 3$
DAP-LNC-CS 5% (lactose)	$69\pm 2$	$1,50\pm 0,2$	$691\pm 3$	$514\pm 2$	$80,7\pm 3$
DAP-LNC-CS 10% (lactose)	$68\pm 1$	$1,50\pm 0,1$	$344\pm 8$	$321\pm 3$	$82,8\pm 2$

PD\*: Perda por dessecação

nd: Não determinado

\*\*Valores obtidos em 30 minutos de desaglomeração em via úmida por volume

\*\*\* Valores obtidos em 30 minutos de desaglomeração em via úmida por número.

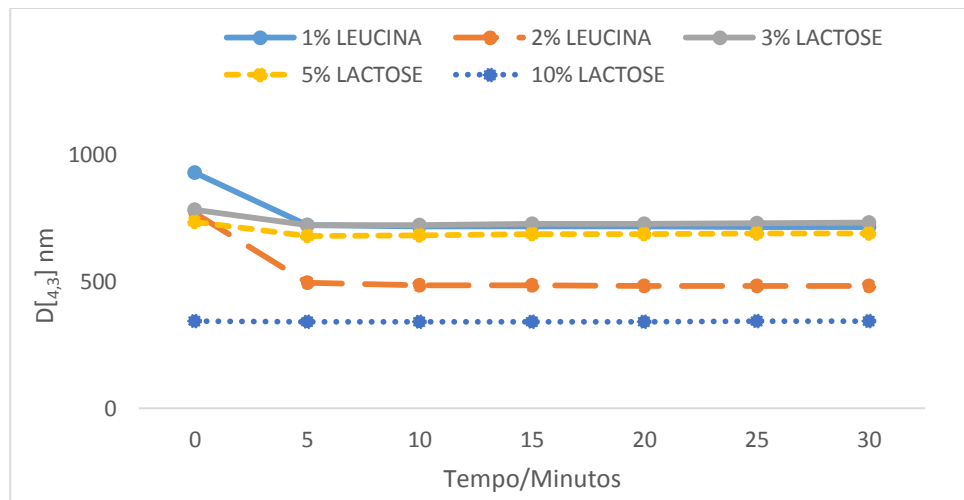


Figura 14: Gráfico de desaglomeração dos pós por diâmetro médio  $D_{[4,3]}$  por volume em nm.

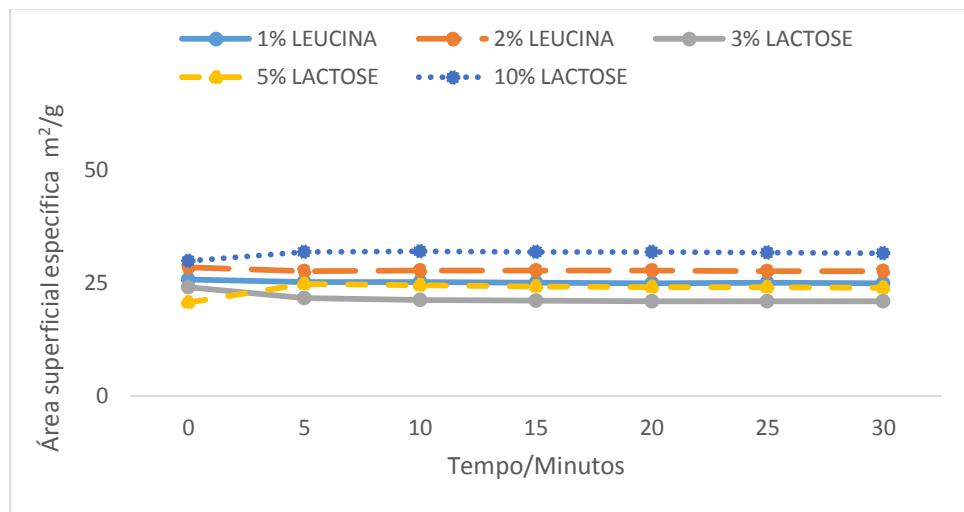


Figura 15: Gráfico da área superficial específica em  $m^2/g$ .

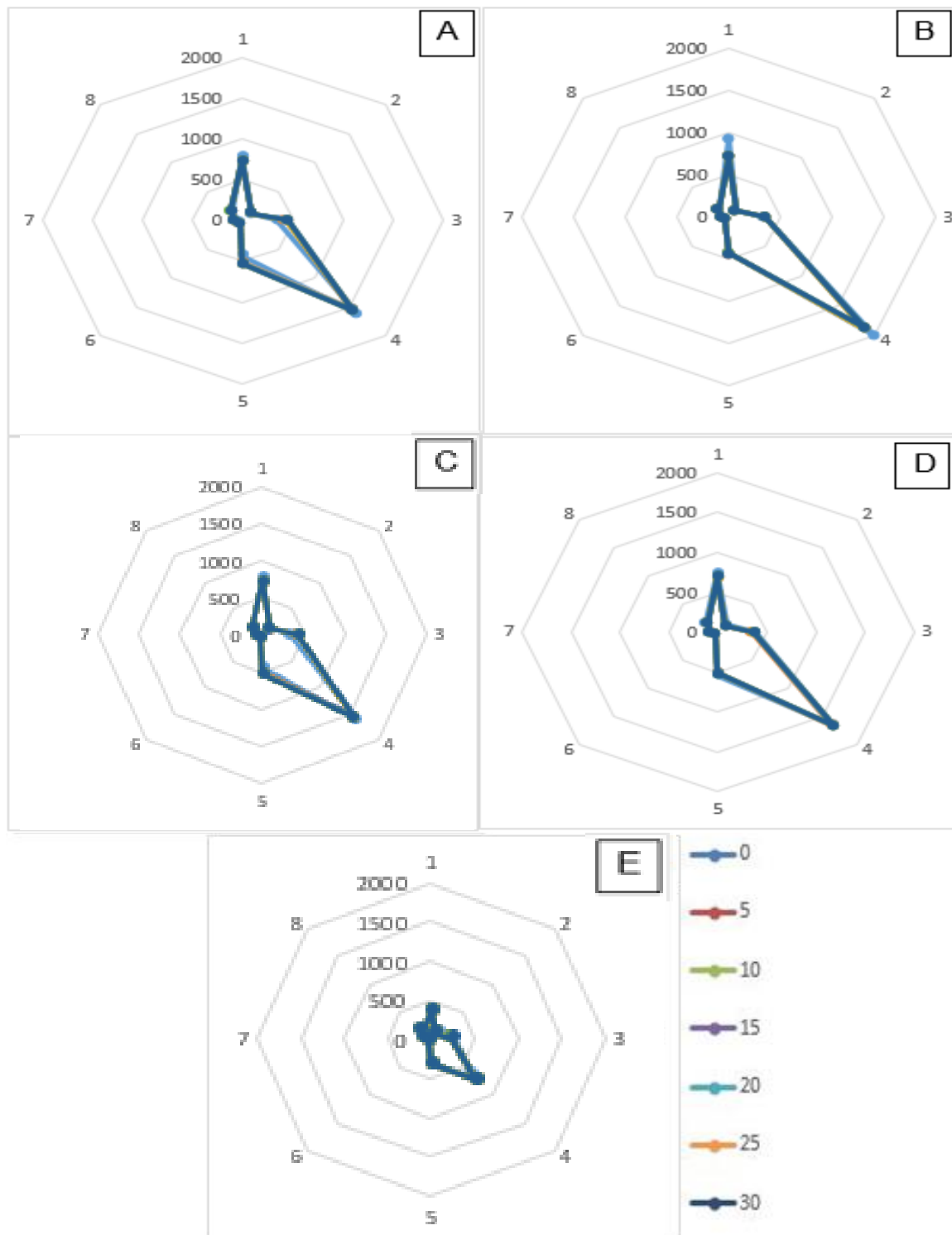


Figura 16: Gráficos de radar plotado a partir dos dados de difração de laser das amostras DAP-LNC-CS secas com 1% (a) e 2% (b) de leucina e (c) 3%, (d) 5% e (e) 10% de lactose. As linhas referem se aos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, e 30 minutos de desaglomerações em água. [eixos: 1 corresponde ao diâmetro médio por volume das partículas,  $D[4,3]_v$ ; 2 é o diâmetro em volume no percentil de 10% da curva de distribuição,  $d(0,1)_v$ ; 3 é o diâmetro em volume no percentil de 50% da curva de distribuição,  $d(0,5)_v$ ; 4 é o diâmetro em volume no percentil de 90% da curva de distribuição,  $d(0,9)_v$ ; 5 corresponde ao diâmetro médio por número das partículas,  $D[4,3]_n$ ; 6 representa o diâmetro por número no percentil de 10% da curva de distribuição,  $d(0,1)_n$ ; 7 é o diâmetro por número no percentil de 50% da curva de distribuição,  $d(0,5)_n$  e 8 corresponde ao diâmetro em número no percentil de 90% da curva de distribuição,  $d(0,9)_n$ ].

Com base nos resultados anteriores obtidos de teor, massa e distribuições de diâmetros das partículas foram selecionadas as formulações que compõem as concentrações de 1 e 2% de leucina (DAP-LNC-CS -1% e 2% de leucina) com a finalidade de obter um produto farmacêutico para futuras aplicações.

Quando analisadas no tempo 0 (inicial) percebemos que os diâmetros das partículas das formulações são maiores e assim observamos que com o passar dos tempos os diâmetros foram diminuindo tanto por volume quanto por escala numérica. Por meio destes dados acima de desaglomeração das partículas observamos que os resultados macroscopicamente não demonstraram diferenças significativas entre 5 e 30 minutos, no entanto, foram realizadas análises estatísticas para comprovar esta hipótese. Por meio das análises estatísticas não houve diferenças significativas entre as amostras considerando um valor  $p < 0.05$ . Os dados obtidos estão expressos no gráfico da figura 17.

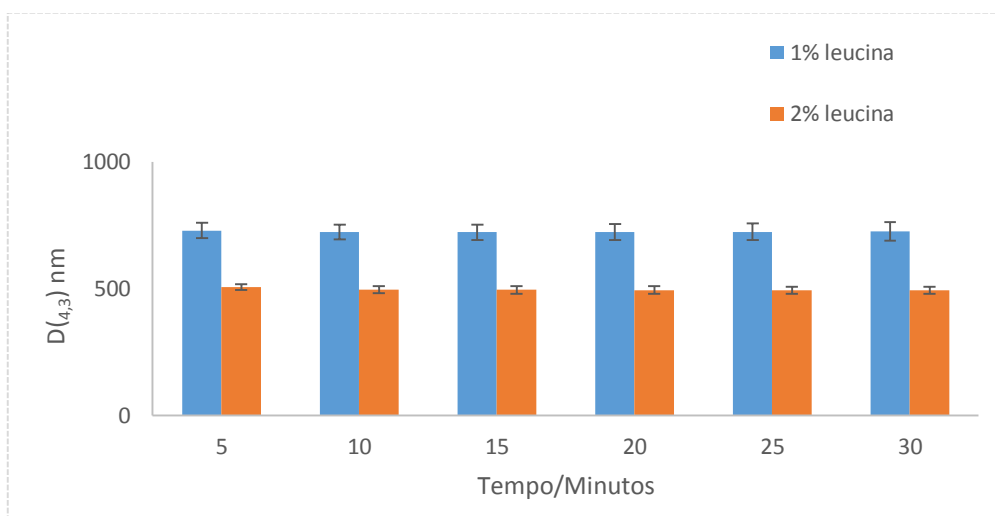


Figura 17: Gráfico das análises estatísticas da desaglomeração dos pós de 5 a 30 minutos analisados por  $D_{[4,3]}$  em nm.

Após 5 minutos de desaglomeração dos pós das nanocápsulas em água os diâmetros médios  $D_{[4,3]}$  por volume foram de  $729 \pm 0,03$  nm (DAP-LNC-CS 1% leucina) e  $506 \pm 0,01$  nm (DAP-LNC-CS 2% leucina). O diâmetro médio  $D_{[4,3]}$  por número foi de  $478 \pm 40$  nm (DAP-LNC-CS-1% de leucina) e  $417 \pm 17$  nm (DAP-LNC-CS 2% de leucina).

Quando as partículas são redispersas em água o adjuvante de secagem tende a dissolver as partículas tornando-as menores e mais próxima do seu diâmetro original. O que podemos perceber é que durante todos os tempos de desaglomeração

obtivemos partículas em escala nanométrica e micrométrica com uma diminuição do tamanho com o passar dos tempos.

Por meio das imagens obtidas de microscopia eletrônica de varredura verificou-se a presença de aglomerados morfológicos e também a superfície irregular das partículas conforme figura 18.

Futuramente estas formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona revestidas com quitosana e secas com leucina podem fornecer produtos intermediários para futuras aplicações biológicas, como por exemplo, aplicações para via respiratória a fim de combater processos infecciosos causados pelos *Aspergillus ssp.* e também em aplicações tópicas para evitar as infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus*.

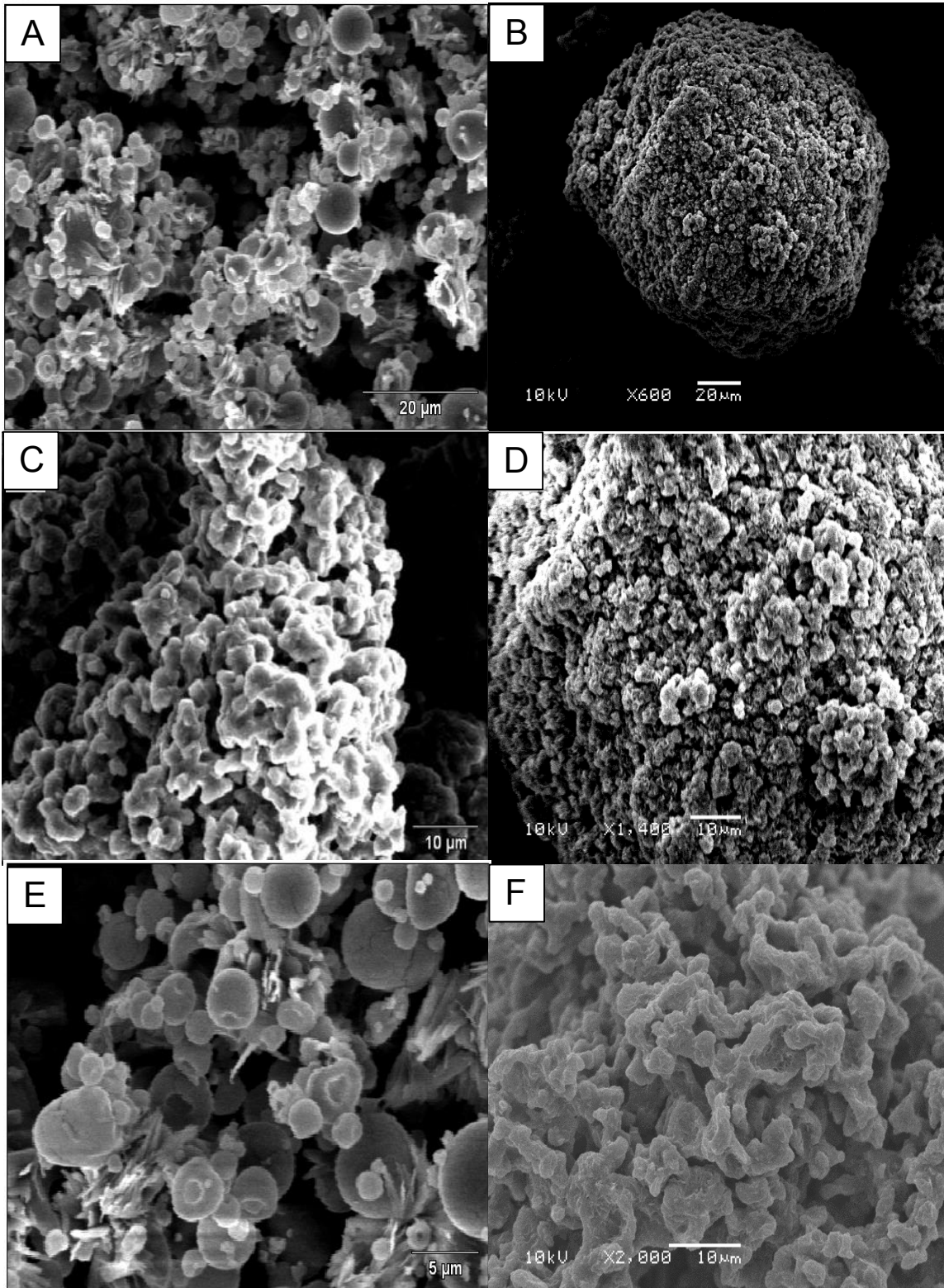


Fig 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações secas com leucina. a) Leucina 1% x 20µm; b) Leucina 2% x 20µm; c) Leucina 1% x 10µm; d) Leucina 2% x 10µm; e) Leucina 1% x 5µm e f) Leucina 2% x 10µm.







No presente estudo as nanocápsulas de núcleo lipídico apresentam características físico-químicas adequadas para sistemas de entrega de fármacos. Estudos anteriores demonstraram que as nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas em nosso grupo exibiram comportamentos físico químicos adequados de distribuição das partículas. Em outros estudos com nanocápsulas foram usados materiais de revestimento em razão das suas potencialidades e caracterizadas quanto ao teor de fármaco, diâmetro médio, potencial zeta, análise morfológica, análise granulométrica e estudos *in vitro* e *in vivo* (CATTANI *et al.*, 2010; FROZZA *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010 ;POHLMANN *et al.*, 2013; BENDER *et al.*, 2012; BENDER *et al.*, 2014).

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico e as com dapsona revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 e fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana apresentaram distribuição unimodal quando analisadas pelas técnicas de caracterização físico químicas deste estudo. Estudos de caracterizações de nanocápsulas de núcleo lipídico demonstraram valores de perfis de distribuições próximos (BENDER *et al.*, 2012; BENDER *et al.*, 2014). Os índices de polidispersão (PDI) das formulações ficaram abaixo de 0,2. Quando a polidispersão é inferior a 0,2 indica-se que a amostra possui baixa polidispersão e uma adequada homogeneidade (BENDER *et al.*, 2014).

Subjetivamente os perfis da distribuição de tamanho das nanopartículas monodispersas, unimodais e simétricas propicia gráficos radar com diferentes valores de diâmetros das partículas. Porém, os sistemas de administração de fármacos desenvolvidos experimentalmente apresentam distribuições de tamanho unimodais de modo geral com diferentes graus de polidispersão. A polidispersão pode causar mudanças nos valores dos diâmetros tornando os gráficos de radar em forma assimétrica, no entanto, as formulações que têm distribuições de tamanhos de partículas multimodal e alta polidispersão podem ser descartadas durante seu estudo de pré-desenvolvimento (BIANCHIN *et al.*, 2015).

O potencial zeta para as formulações revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 foi negativo e positivo para formulações revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana. Os valores estão de acordo com aqueles previamente atribuídos para nanopartículas revestidas com ambos os materiais visto que a fosfatidilcolina mesmo sendo uma molécula dipolar possui ácido fosfático como contaminante originando potencial de superfície negativo (MOSQUEIRA *et al.*,

2000) e a quitosana um polímero catiônico que após a reação interfacial com a superfície das nanocapsulas confere-lhes um potencial positivo.

O pH das formulações das nanocápsulas apresentaram graus de acidez. O pH da solução da quitosana é um fator importante que também pode influenciar a atividade microbiana deste polissacárideo (TAN *et al.*, 2013). A quitosana adquire densidade de cargas positivas em efeitos antimicrobianos quando seu pH é inferior ao seu pKa (6,5) (MARTINS *et al.*, 2014).

O Teor para as formulações variou entre  $0,880 \pm 5,13$  a  $1,024 \pm 0,01$  mg/ml, para média e desvio padrão as análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação da formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestida com fosfatidilcolina e polissorbatato 80 e para a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com fosfatidilcolina, polissorbatato 80 e quitosana foram superiores a 80%.

A dapsona possui um log de D de 0,93 que de acordo com Oliveira e colaboradores (2013) se enquadra no mecanismo de encapsulamento do tipo III, ou seja, o fármaco estaria disperso mais na parede das nanocápsulas do que no núcleo. No entanto, o algoritmo desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2013) foi baseado em LNC revestidas apenas com polissorbatato 80. Sugerimos então que a dapsona teria a tendência de estar mais concentrada na interface partícula-água nas LNC revestidas com polissorbatato 80 e fosfatidilcolina assim como nas LNC-CS revestidas com polissorbatato 80, fosfatidilcolina e quitosana.

A microanálise química elementar mostrou que as amostras de LNC e DAP-LNC apresentaram a composição química de carbono (C), oxigênio (O), fósforo (P) e alumínio (Al) e as amostras de LNC-CS e DAP-LNC-CS apresentaram carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N) e fósforo (P). A composição de alumínio foi encontrada em virtude das grades de análises serem de alumínio.

Em um modelo proposto por Fiel *et al.*, 2013 ficou evidenciado que a aglomeração e agregação podem ser considerados dois passos de um processo de separação de fases as quais envolvem: a dessorção dos estabilizadores que conduzem a uma aglomeração das partículas coloidais (gotículas) e segundo (ii) a agregação das partículas coloidais (coalescência). Por mais que as nanocápsulas desenvolvidas por Fiel e col. 2013 não sejam as mesmas usadas neste estudo os dados indicam similaridades entre os sistemas. No presente estudo foi demonstrado que as nanocápsulas são rodeadas por estruturas micelares com diâmetros e núcleos

diferentes, apresentando-se em 4 camadas de micelas revestindo as LNC conforme modelo representativo da figura 13. Fiel e colaboradores (2013) haviam proposto que nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico estariam revestidas por micelas de tensoativos, no caso do uso de polissorbato 80, e por vesículas e micelas no caso do uso de polissorbato 80 e fosfatidilcolina. As fotomicrografias obtidas no presente estudo confirmam esse modelo. De acordo com as imagens da figura 11 observamos uma sequência de transformações de micelas esféricas em cilíndricas onde percebemos pequenas e grandes deformações até sua transformação. As transformações micelares de forma esféricas em cilíndricas já foram descritas por outros autores (ZHAO, Y *et al.*, 2010; SHARMA, GANGULI, 2014; GRETHE *et al.*, 2014). As micelas poliméricas são pertencentes à classe de polímeros anfifílicos com escala nano de 1-200 nm e sua estrutura é constituída por um núcleo que é geralmente hidrofóbica, enquanto o exterior o qual também é conhecido como Corona representa um bloco hidrofílico do copolímero (GOTHWAL, KHAN, GUPTA, 2016).

Em estudo anterior foi observado que a dapsona administrada em solução não inibiu o crescimento bacteriano mesmo em concentração elevada (>1125 µg/ml) não suprimindo assim o crescimento de cepas de bactérias sensíveis. Os resultados demonstraram que concentrações com até 1125 µg/ml não obtiveram resposta de inibição de crescimento bacteriano em cepa ATCC de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (WOLF, ORNI-WASSERLAUF, 2000). Em nosso estudo os resultados demonstraram uma redução de até dez vezes na concentração de dapsona quando nanoencapsulada em sistema nanoestruturado revestidos com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana em comparação com a administração da dapsona em solução. As nanocápsulas de núcleo lipídico sem fármaco revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana (LNC-CS) também inibiram o crescimento bacteriano quando a quitosana foi administrada em concentrações relativas, conforme descritas na tabela 5. Desta forma, pode-se calcular as concentrações inibitórias mínimas de dapsona e de quitosana quando em nanocápsulas de núcleo lipídico como respectivamente variando de 109 a 510 µg/ml de dapsona e 0,250 µg/ml de quitosana para as formulações de LNC-CS e DAP-LNC-CS.

O que podemos observar é que a quitosana possui atividade em pequenas concentrações na superfície das partículas, a desvantagem da utilização de partículas de quitosana e a sua concentração é maciça e alta. Para obter uma concentração de

quitosana inferior e uma área de superfície elevada foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestida com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e com quitosana.

A atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por inúmeros fatores os quais incluem sua concentração, grau de desacetilação, peso molecular e o solvente usado (NO *et al.*, 2002; NO *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2014). Diversos estudos sobre as características antimicrobianas dos filmes feitos de quitosana e seus derivados têm sido relatados (SUN *et al.*, 2014; INTA, YOKSAN, LIMTRAKUL, 2014; LECETA *et al.*, 2013; FOLLMANN *et al.*, 2012) tais como, os filmes apresentaram uma elevada atividade antimicrobiana contra vários microorganismos patogênicos em efeitos bacterianos para cepas de *S. aureus*, *B. Subtilis*, e *E. coli* e em espécies fúngicas de *A. fumigatus*, *G. Candidum*, e *C. Albicans* (MOHAMED, MOHAMED, SEOUDI, 2014). A quitosana em forma de filme demonstrou maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas como por exemplo, esta apresentou índices mais elevados de inibição para *Bacillus subtilis* sobre *E. coli* (MOHAMED, MOHAMED, SEOUDI, 2014).

O potencial zeta tem sido sugerido como um fator fundamental para efeitos antibacterianos e antifúngicos da quitosana por meio da interação com a superfície carregada negativamente da microbiana (CHEN *et al.*, 2010). Este dado coincide com outro estudo descrito por Qi *et al* (2004) o qual demonstrou que nanopartículas de quitosana exibiram maiores atividades antimicrobianas em virtude de suas características como seu tamanho pequeno e compactação das partículas bem como carga de superfície elevada. Neste estudo a distribuição do tamanho por intensidade das nanopartículas de quitosana variaram de 28,3 a 48,7 nm com um diâmetro médio de cerca de 40 nm (Qi *et al.*, 2004). Qi *et al.*, (2004) também demonstrou que as nanopartículas de quitosana e nanopartículas contendo cobre podem inibir o crescimento de vários microorganismos. As nanopartículas de quitosana podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos com alta atividade antibacteriana e biocompatibilities.

Os efeitos de inibições de crescimentos bacterianos podem ser atribuídos aos possíveis efeitos da quitosana devido suas potenciais aplicações e propriedades de inibir o crescimento das bactérias conforme estudadas e descritas anteriormente por diversos autores (Qi *et al.*, 2004; JEON, PARK, KIM, 2001; MARTINS *et al.*, 2014). De

acordo com a literatura, a quitosana possui atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (QI *et al.*, 2004; JEON, PARK, KIM, 2001).

Nanopartículas lipídicas sólidas contendo timicosina inibiram o crescimento bacteriano por um tempo mais longo quando comparado com os grupos sem nanopartículas de lipídicas sólidas. As pesquisas indicam que as nanopartículas lipídicas sólidas podem ser um sistema eficaz para a entrega de timicosina aumentando assim a sua ação terapêutica contra *S. aureus* (WANG *et al.*, 2012).

Em nosso estudo verificamos que as nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana em sua superfície também apresentou atividade antifúngica contra as cepas testadas porém quando comparadas com a formulação DAP-LNC-CS notamos uma redução da atividade antifúngica, ou seja, a formulação de DAP-LNC-CS teve melhor atividade quando nanorevestidas com quitosana. Assim podemos sugerir que o revestimento de quitosana na superfície das nanocápsulas de núcleo lipídico podem influenciar diretamente na atividade antibacteriana e antifúngica.

A quitosana na forma de polímero apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus oryzae*, *Phomopsis asparagi*, *Rhizopus stolonifer* (GUERRA-SÁNCHEZ *et al.*, 2009; ZIANI *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2007). Sua atividade antifúngica é contribuída pela natureza policationica da quitosana, ou seja, a quitosana exibe atividade antifúngica natural sem a necessidade de qualquer modificação química estrutural (ZIANI *et al.*, 2009).

A influência do tamanho das partículas e do potencial zeta na atividade antifúngica foi estudada em cepas de *C. albicans*, *F. solani*, e *A. niger* utilizando amostras de nanopartículas com diferentes tamanhos e potencial zeta (ING *et al.*, 2012). Vários fatores podem afetar o tamanho das partículas, e um destes inclui a concentração e peso molecular da quitosana. As concentrações de quitosana críticas para a formação espontânea de grandes agregados de partículas são de 0,65%, 0,25%, 0,15% (w/v) em pH 4,0, e 1,00%, 0,85%, 0,75% (w/v) em pH 5,0 para quitosana de baixo, médio e alto peso molecular com grau de desacetilação de 86,6%, 84,7%, e 82,5% (GAN *et al.*, 2005).

As formulações com a concentração de 1,2 % w/v de quitosana em forma de nanopartículas foram propostas para aumentar o efeito antifúngico (ING *et al.*, 2012). As nanopartículas de quitosana tem o potencial de se tornar um agente antifúngico natural, poderoso e seguro. Além disso, as nanopartículas de quitosana policationicas com carga de superfície elevada irão interagir de forma mais eficaz

com o fungo em comparação com a forma livre do polímero de quitosana (ING *et al.*, 2012; QI *et al.*, 2004).

As nanopartículas poliméricas composta de PLGA e vitamina E-TPGS, contendo anfotericina B exibiram atividades antifúngicas revelando ser um sistema eficaz para o tratamento de aspergilose invasiva, indicando ser ideal para a entrega e distribuição oral (ITALIA *et al.*, 2011). Estudo *in vivo* indicou melhor atividade antifúngica de eugenol para cepas de *Candida albicans* quando administradas com nanopartículas lipídicas sólidas compostas de ácido esteárico ou ácido esteárico, triglicéridos caprílico e 1% w/v de poloxamer 188 (SINGH, 2011).

Em outros trabalhos que propuseram sistemas nanoestruturados como as nanocápsulas os resultados mostraram atividades antifúngicas mesmo em concentrações menores de cetoconazol. A nanoencapsulação do cetoconazol reduziu os MICs em todos os isolados avaliados neste estudo com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 0,0313 para 2,0 µg/ml. Estas nanopartículas apresentaram susceptibilidade *in vitro* antifúngica contra cepas de *Candida spp* (FUENTEFRÍA *et al.*, 2014).

Outro estudo demonstrou que o uso de nanocápsulas de Eudragit®RS 100 preparadas com óleo de coco e clotrimazol apresentaram diâmetro médio de 200 nm com um índice de polidispersão inferior a 0,2. As nanocápsulas exibiram atividades antifúngicas contra cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol. A associação do clotrimazol e do óleo de coco mostraram resultados diferentes para nanocápsulas, no caso, a atividade antifúngica ocorreu principalmente devido ao clotrimazol (SANTOS *et al.*, 2014).

A secagem de diversos sistemas nanoparticulados ou de emulsões (CHRISTENSEN, PEDERSEN, KRISTENSEN, 2001), lipossomas (GOLDBACHART, BROCHART, STAMM, 1993), nanoesferas (POLHMANN *et al.*, 2002) e nanocápsulas (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007) é uma alternativa tecnológica para a obtenção de pós secos que podem ser utilizados como produtos intermediários ou produtos finais farmacêuticos. Diferentes técnicas de secagem são utilizadas na indústria farmacêutica e uma delas é a aspensão (spray-drying). Diversos adjuvantes de secagens foram propostos para prevenir a coalescência, a agregação ou perda de material na secagem de sistemas nanoparticulados poliméricos como por exemplo o dióxido de silício (Muller *et al.*, 2000) ou a lactose (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007). O uso de adjuvantes de secagem se deu em virtude de que em alguns sistemas não era



possível secar as formulações por causa da forte aderência dos produtos nas paredes da torre de secagem do equipamento. Os adjuvantes foram introduzidos com a finalidade de facilitar o processo de secagem aumentando o tempo de armazenamento e estabilidade dos produtos (MULLER *et al.*, 2000; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007). Pode ocorrer durante o processo de secagem uma segregação do fármaco e dos materiais porém isso irá depender das matérias-primas ou dos parâmetros empregados durante a secagem (DOMINGUES *et al.*, 2008; BECK *et al.*, 2006).

O tamanho das partículas e sua alta área superficial específica proporcionam características de fluxo adequados que são usados com a finalidade de melhorar as propriedades dos pós secos (ROWE, SHESKEY, WELLER, 2003). O comportamento da redispersão dos pós secos é avaliado pela técnica de difração de laser em modo úmido para demonstrar que os pós a partir de um tempo de dispersão são capazes de recuperar suas características nanométricas (OURIQUE *et al.*, 2014).

Marchiori *et al.*, (2011) obtiveram um teor de 95% após secar as nanocápsulas núcleo lipídico por aspersão contendo tretinoína sendo este um fármaco que sofre fotodegradação por meio da luz ultravioleta. Após 2 minutos de redispersão dos pós foi observado que o diâmetro médio das nanocápsulas foi de  $204 \pm 2$  nm com um índice de polidispersidade de 0,26 e as dispersões de tretinoína em nanoemulsão mostrou partículas com tamanho médio de  $251 \pm 9$  nm com um índice de polidispersidade de 0,34. As partículas após a redispersão mostraram valores semelhantes aos valores das partículas antes da redispersão.

Por meio do uso do processo de secagem três problemas relacionados com a entrega pulmonar foram solucionados; as nanopartículas foram estabilizadas contra degradação hidrolítica, podem ser armazenadas e novamente ressuspensas sem alteração de tamanho e sua entrega poderia ser facilitada usando inaladores de pó seco (LEBHARDT *et al.*, 2011).

Neste estudo os diâmetros médios das partículas secas demonstraram que os perfis granulométricos dependem do tempo da redispersão preceptora. No tempo inicial da redispersão (tempo 0") as partículas apresentaram diâmetros relativamente maiores quando comparados com a redispersão após 30 minutos em água, conforme pode ser observado nos gráficos de radar. Quando analisadas as formulações de nanocápsulas nos tempos iniciais da redispersão constatamos três populações, uma em escala nanométrica e duas em escalas micrométricas. De acordo com Marchiori (2011) as partículas recuperadas após a redispersão apresentaram tamanhos médios

similares em comparação com as suspensões originais porém com um pequeno aumento nos índices de polidispersão. As recuperações de diâmetros das partículas após serem resdispersadas já foram relatadas em outros estudos anteriormente em sistemas nanoparticulados (TEWA-TAGNE, BRIANÇON, FESSI, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008) deste modo, ambos estudos apresentaram a capacidade de recuperar suas partículas após suas dispersões aquosas.

## VII. CONCLUSÃO GERAL

---

---

Várias infecções causadas por cepas de bactérias e fungos multirresistentes tem sido objeto de preocupação nos meios científicos e acadêmicos. Os sistemas nanoestruturados os quais incluem as nanocápsulas de núcleo lipídico são considerados bons agentes antibacterianos e antifúngicos que podem ser usados para diversos fins terapêuticos.

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico e as com dapsona revestidas com fosfatidilcolina e polissorbato 80 e fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana apresentaram distribuição unimodal com índices de polidispersão inferiores a 0,2 indicando uma baixa polidispersão e uma adequada homogeneidade das formulações.

No presente estudo foi demonstrado que as nanocápsulas são rodeadas por estruturas micelares com diâmetros e núcleos diferentes apresentando-se em 4 camadas de micelas revestindo as LNC. Observamos também uma sequência de transformações de micelas esféricas em cilíndricas na coroa hidrofílica das LNC.

Os resultados demonstraram uma redução de até dez vezes na concentração de dapsona quando nanoencapsulada em sistema nanoestruturado revestidos com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana em comparação com a administração da dapsona em solução para efeitos antibacterianos. As LNC-CS também inibiram o crescimento bacteriano e fúngicos quando a quitosana foi administrada nas concentrações relativas.

As nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com fosfatidilcolina, polissorbato 80 e quitosana aumentaram significativamente os efeitos antibacterianos e antifúngicos quando comparadas com as formulações sem o revestimento de quitosana. O efeito da quitosana demonstrou elevado potencial para inibir o crescimento bacteriano e fúngico.

Os pós das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona revestidas com quitosana e secas com leucina desenvolvidos apresentaram produtos intermediários para futuras aplicações biológicas, tanto para via respiratória a fim de combater processos infecciosos causados pelos *Aspergillus ssp.* e também em aplicações tópicas para coibir as infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus*.



## VIII. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS

---





ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasilia, 2010b.

AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. J.; NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p.42–58, 2010.

AHMAD, R. A.; ROGERS, H. J. Pharmacokinetics and Protein Binding Interactions of Dapsone and Pyrimethamine. *Br. J. clin. Pharmac*, v. 10, p. 519-524, 1980.

AMARE, M. G.; KELLER, N. P. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, v. 66 p.11–18, 2014.

ALI, S.W.; JOSHI, M.; RAJENDRAN, S. Modulation of size, shape and surface charge of chitosan nanoparticles with reference to antimicrobial activity. *Advanced Science Letters*, v. 3, p. 452-460, 2010.

AUNDHIA, C. J.; RAVAL, J. A.; PATEL, M. M.; SHAH, N. V.; CHAUHAN, S. P.; SAILOR, G. U.; JAVIA, A. R.; MAHASHWARI, R. A. Spray Drying in the Pharmaceutical Industry – A Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, v.2, p.125-138, 2011.

BECK, R. C. R.; HAAS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A. R. Nanoparticle-coated organic-Inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. *Quim. Nova*, v. 29, p. 990-996, 2006.

BECK, R. C. R.; LIONZO, M. I. Z.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RÉ, M. I.; GALLAS, M. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Surface morphology of spray-dried nanoparticle coated microparticles designed as an oral drug delivery system. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p. 389 - 398, 2008.

BENDER, E. A.; ADORME, M.D.; COLOMÉ, L.M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v.426, p. 271-279, 2012.

BENDER, E. A.; CAVALCANTE, M. F.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S.; ABDALLA, D. S. P.; POHLMANN, A. R. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. *Pharm Res*,v 31, p. 2975–2987, 2014.

BIANCHIN, M. D.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; OLIVEIRA, C. P.; CONTRI, R. V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous

formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 30, p.180 -189, 2015.

BIRCH, N. P.; SCHIFFMAN, J. D. Characterization of Self-Assembled Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Formed from Chitosan and Pectin. *Langmuir*, v. 30, p.3441–3447, 2014.

BLANCO-PADILLA, A.; SOTO, K. M.; ITURRIAGA, M. H.; MENDOZA, S. Food Antimicrobials Nanocarriers. *The Scientific World Journal*, p.1-11, 2014.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev*, v, 38, p. 1759–1782, 2009.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOME, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p.116–124, 2010.

COLEMAN, M. D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. *British Journal of Dermatology*, v. 129, p. 507-513, 1993.

COUVREUR, P.; TULKENS, P.; ROLAND, M.; TROUET, A.; SPEISER, P. Nanocapsules: A new type of lysosomotropic carrier. *Febs Letters*, v. 84, p.323-326, 1977.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; GUIOT, P.; BAUDUIN, P.; SPEISER, P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharn. Pharmacol*, v. 31, p.331-332, 1979.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. *Critical™ Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 19, p.99-134, 2002.

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; 2012.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, second ed. Document M38-A2, Wayne, PA, USA.

CHABI, M.L.; GORACCI,A.; ROCHE,N.; PAUGAM, A.; LUPO, A.; REVEL, M.P. Pulmonary aspergillosis. *Diagnostic and Interventional Imaging*, v. 96, p. 435-442, 2015.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nature Reviews/Microbiology*, v. 7, p. 629-641, 2009.

CHEN, J.; WANG, F.; LIU, Q.; DU, J. Antibacterial polymeric nanostructures for biomedical applications. *Chem. Commun*, v. 50, p.14482-14493, 2014.

CHEN, L. C.; KUNG, S. K.; CHEN, H. H.; LIN, S. B. Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p.913–919, 2010.

CHRISTENSEN, K. L.; PEDERSEN, G. P.; KRISTENSEN, H. G. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 212, p. 187–194, 2001.

CHHONKERA, Y. S.; PRASADA, Y. D.; CHANDASANA, H.; AKHILESH VISHVKARMA, A.; MITRA, K.; SHUKLA, P. K.; BHATTA, R. S. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 1451–1458, 2015.

CHIOU, C. C.; MAVROGIORGOS,N.;TILLEM, E.; HECTOR, R.; WALSH, T. J. Synergy, Pharmacodynamics, and Time-Sequenced Ultrastructural Changes of the Interaction between Nikkomycin Z and the Echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45. p. 3310–3321, 2001

DASH, T. K.; BADIREENATH KONKIMALLA, V. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, v. 158, p.15–33, 2012.

DEACON, J.; ABDELGHANY, S. M.; QUINN, D. J.; SCHMID, D.; MEGAW, J.; DONNELLY, R. F.;JONES, D. S.; KISSENFENNIG, A.; ELBORN, J. S.; GILMORE, B. E. TAGGART, C. C.; SCOTT, C. J. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *Journal of Controlled Release*, v. 198, p. 55–61, 2015.

DENNING, D. W. Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, p. 781-803, 1998.

DE BEULE, K. D. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 6, p.175-181, 1996.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; PATRI, A. K.; ZHENG, J.; CLOGSTON, J. D.; AYUB, N.; AGGARWAL, P.; NEUN, B. W.B.S.; HALL, J. B.; McNEIL, S. E. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 5, p.106-117, 2009.

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

ERJAVEC, Z.; KLUIN-NELEMANS, H.; VERWEIJ, P. E. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, v. 15, p.625–633, 2009.

ESMAEILI, A.; RAFIEE, R. Preparation and biological activity of nanocapsulated *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glabra*. *Flavour Fragr. J.v.* 30, p. 113-119, 2015.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. *In Vitro* Antileishmanial Activity of Amphotericin B Loaded in Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanospheres. *Journal of Drug Targeting*, v. 10, p. 593-599, 2002.

FERNANDES, M. M.; FRANCESKO, A.; TORRENT-BURGUÉS, J. CARRIÓN-FITE, F. J.; HEINZE, T.; TZANOV, T. Sonochemically Processed Cationic Nanocapsules: Efficient Antimicrobials with Membrane Disturbing Capacity. *Biomacromolecules*, v. 15, p.1365–1374, 2014.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A. M.; LAFONT, O. Primidone-loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, p.107–111, 1999.

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

FOLLMANN, H. D. M.; MARTINS, A. F.; GEROLA, A. P.; BURGO, T. A. L.; NAKAMURA, C. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Antiadhesive and Antibacterial Multilayer Films via Layer-by-Layer Assembly of TMC/Heparin Complexes. *Biomacromolecules*, v. 13, p. 3711–3722, 2012.

FUENTEFRIA, A. M.; JESUS, R. S.; BACK, P. I.; OLIVEIRA, T. V.; KNECHT, H.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. Ketoconazole-Loaded Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp. *Lat. Am. J. Pharm*, v. 33, p. 1589-95, 2014.

FROMM, E.; WITTMANN, J. Derivate des p-nitrothiophenols. *Ber Dtsch Chem Ges*, v. 41, p. 2264–2273, 1908.

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

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 44, p.65–73, 2005.

GAVHANE, Y. N.; GURAV, A. S.; YADAV A.V. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 4, p. 312-331, 2013.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped *trans*-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*, v. 76, Nr. 2, 2011

GOTHWAL, A.; KHAN, I.; GUPTA, U. Polymeric Micelles: Recent Advancements in the Delivery of Anticancer Drugs. *Pharm Res*, v. 33, p.18–39, 2016.

GOLDBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-Drying of Liposomes for a Pulmonary Administration. I. Chemical Stability of Phospholipids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 19, p. 2611-2622, 1993.

GROLL, A. H.; SHAH, P. M.; MENTZEL, C.; SCHNEIDER, M.; JUST-NUEBLING, G.; HUEBNER, K. Trends in the Postmortem Epidemiology of Invasive Fungal Infections at a University Hospital. *Journal of Infection*, v. 33, p. 23-32, 1996.

GRUNWALD, M. H.; AMICHAÏ, B. Dapsone - the treatment of infectious and inflammatory diseases in Dermatology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 7, p. 187- 192, 1996.

GUERRA-SÁNCHEZ, M. G.; VEGA-PÉREZ, J.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. Antifungal activity and release of compounds on

*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 93, p.18–22, 2009.

Hadinoto, K.; Cheow, W. S. Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 116, p.772–785, 2014.

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

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M.; VASILE, B. S.; TRUȘCĂ, R.; CRISTESCU, R.; SOCOL, G.; IORDACHE, F. Antimicrobial nanospheres thin coatings prepared by advanced pulsed laser technique. *Beilstein J. Nanotechnol*, v.5, p. 872–880, 2014.

HO-KYUNG, H.; JIN W. K.; MEE-RYUNG, L.; WON-JAE, L. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ $\beta$ -lactoglobulin nanoparticle. *Food Research International*, v. 52, p. 82–90, 2013.

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

ISO/TC 229 Nanotechnologies. Disponível em: [http://www.iso.org/iso/iso\\_technical\\_committee?commid=381983](http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983). Acesso em 07/02/2016.

INTA, O.; YOKSAN, R.; LIMTRAKUL, J. Hydrophobically modified chitosan: A bio-based material for antimicrobial active film. *Materials Science and Engineering C*, v. 42, p. 569–577, 2014.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *International Journal of Biomaterials*, v.2012, p.1-9, 2012.

ITALIA, J. L.; SHARP, A.; CARTER, K. C.; WARN,P.; RAVI KUMAR, M. N. V. Peroral Amphotericin B Polymer Nanoparticles Lead to Comparable or Superior In Vivo

Antifungal Activity to That of Intravenous Ambisome® or Fungizone™. *PLoS One*, V. 6, p. 8, 2011.

JAIN, M. S.; LOHARE, G. B.; BARI, M. M.; CHAVAN, R. B.; BARHATE, S. D.; SHAH, C. B. Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review. *Research J. Pharma. Dosage Forms and Tech*, v. 2, p. 74-79, 2011.

JAHROMI, M. A. M.; AL-MUSAWI, S.; PIRESTANI, M.; RAMANDI, M. F.; AHMADI, K.; RAJAYI, H.; HASSAN, Z. M.; MAHDI KAMALI, M.; MIRNEJAD, R. Curcumin-loaded Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles as a safe, natural and effective antibiotic inhibits the infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. *Iran J Biotech*, v. 12, e1012, 2014.

JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, v. 44, p.71–76, 2001.

JENSEN, G. V.; LUND, R.; GUMMEL, J.; NARAYANAN, T.; PEDERSEN, J. S. Monitoring the Transition from Spherical to Polymer-like Surfactant Micelles Using Small-Angle X-Ray Scattering. *Angew. Chem. Int. Ed*, v. 53, p. 11524 –11528, 2014.

KALITA, S.; DEVI, B.; KANDIMALLA, R.; SHARMA, K. K.; SHARMA, A.; KALITA, K.; KATAKI, A. C.; KOTOKY, J. Chloramphenicol encapsulated in poly-ε- caprolactone–pluronic composite: nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 2971–2984, 2015.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S.H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3, p. 95– 101, 2007.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, v. 469, p. 483-469, 2011.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p.1–27, 2000.

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do Ácido Lipoico via Encapsulação em Nanocápsulas Poliméricas Planejadas Para Aplicação Cutânea. *Quim. Nova*, v.. 32, p. 2078-2084, 2009.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, v. 52, p. 206–222, 2008.

KREUTER, J. Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 331, p. 1-10, 2007.

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 310-350, 1999.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; DE LA CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, v. 116, p.889–899, 2013.

LEBHARDT, T.; ROESLER, S.; UUSITALO, H. P.; KISSEL, T. Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, p. 90–96, 2011.

LIM, Y. H.; TIEMANN, K. M.; HEO, G. S.; WAGERS, P. O.; REZENOM, Y. H.; ZHANG, S.; ZHANG, F.; YOUNGS, W. J.; HUNSTAD, D. A.; WOOLEY, K. L. Preparation and in Vitro Antimicrobial Activity of Silver-Bearing Degradable Polymeric Nanoparticles of Polyphosphoester-block-Poly(L-lactide). *ACS nano*, v. 9, p.1995–2008, 2015.

LOWY, F. D. Staphylococcus Aureus Infections. *The New England Journal of Medicine*, v 10, p. 520-531, 1998.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J. F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROTA, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*, v. 82, p. 319–334, 2002.

MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-Dried Powders Containing Tretinoin-Loaded Engineered Lipid-Core Nanocapsules: Development and Photostability Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 1–9, 2011.

MARCHIORI, M. C.; RASCOVETZKI, R. H.; OURIQUE, A. F.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; BECK, R. C. Improved tretinoin photostability in a topical nanomedicine replacing original liquid suspension with spray-dried powder with no loss of effectiveness. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 4, p. 579-586, 2013.



MARTINS, A. F.; FACCHI, S. P.; FOLLMANN, H. D. M.; PEREIRA, A. G. B.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing *N*-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review. *Int. J. Mol. Sci*, v. 15, p. 20800-20832, 2014.

MATEI, A.; CORNEA, C. P.; MATEI, S.; MATEI, G. M.; COGALNICEANU, G.; RODINO, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using culture filtrates of lactic acid bacteria and analysis of antifungal activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 10, p. 1201-1207, 2015.

MEDDA, S.; AMITA HAJRA, A.; DEY, U.; BOSE, P.; MONDAL, N. K. Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. *Appl Nanosci*, v.5, p.875–880, 2015.

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

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, p. 614–626, 2000.

MOHAMED, N. A.; MOHAMED, R. R.; SEOUDI, R. S. Synthesis and characterization of some novel antimicrobial thiosemicarbazone O-carboxymethyl chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 63, p.163–169, 2014.

MOHANTY, B.; MAJUMDAR, D. K.; MISHRA, S. K.; PANDA, A. K.; PATNAIK, S. Development and characterization of itraconazole-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Pharm Dev Technol*, v. 4, p. 458-464, 2015.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 19, p.19, 129–141, 2011.

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; P. R. PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, p. 343–347, 2000.

NEILANDS, J.; SUTHERLAND, D.; RESIN, A.; WEJSE, P. L.; CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Chitosan Nanoparticles Affect the Acid Tolerance Response in Adhered Cells of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, v. 45, p.501–505, 2011.

NEOFYTOS, D.; HORN, D.; ANAISSIE, E.; STEINBACH, W.; OLYAEI, A.; FISHMAN, J.; PFALLER, M.; CHANG, C.; WEBSTER, K.; MARR, K. Epidemiology and Outcome of Invasive Fungal Infection in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 265–73, 2009.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 65–72, 2002.

NO, H. K.; KIM, S. H.; LEE, S. H.; PARK, N. Y.; PRINYAWIWATKUL, W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate Polymers*, v. 65, p.174–178, 2006.

OLIVEIRA, C. P.; VENTURINI, C. G.; DONIDA, B.; POLETTO, F. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, v.9, p.1141–1150, 2013.

ORTIZ, M.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of Novel Chitosan Microcapsules for Pulmonary Delivery of Dapsone: Characterization, Aerosol Performance, and In Vivo Toxicity Evaluation. *AAPS PharmSciTech* v. 02, 2015.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *J. Biomed. Nanotechnol*, v. 6, p. 214-223, 2010.

OURIQUE, A. F.; CHAVES, P. S.; SOUTO, G. D.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 65, p.174–182, 2014.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Chemotherapeutic potential of alginate–chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 635–640, 2004.

PANKHURST, Q. A.; THANH, N. T. K.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, v. 42, p. 1-15, 2009.

PENG, H. S.; LIU, X. J.; LV, G. X.; SUN, B.; KONG, Q. F.; ZHAI, D. X.; WANG, Q.; ZHAO, W.; WANG, G. Y.; WANG, D. D.; LI, H. L.; JIN, L. H.; KOSTULAS, N. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 29–35, 2008.

POURSHAHAB, P. S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; ESLAHI, H.; FAZELI, M. R. JAMALIFAR, H. Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. *J. Microencapsul*, v. 48, p. 605-613, 2011.

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

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 10, p. 623-638, 2013.

PHAECHAMUD, T. "Hydrophobically modified chitosans and their pharmaceutical applications". *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 1, p. 2-9, 2008.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 2693–2700, 2004.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 76–83, 2009.

RAMASAMY, T.; KHANDASAMI, U. S.; RUTTALA, H.; SHANMUGAM, S. Development of Solid Lipid Nanoparticles Enriched Hydrogels for Topical Delivery of Anti Fungal Agent. *Macromolecular Research*, v. 20, p. 682-692, 2012.

Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Weller, P. J. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th ed. *Pharmaceutical, London*, 2003.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N. S.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-

core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 116, p. 270–276, 2014.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.

SINGH, A. G. S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, p. 280-288, 2011.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 587–597, 2010.

SUN, X.; WANG, Z.; KADOUH, H.; ZHOU, K. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosanegalic acid films. *LWT - Food Science and Technology*, v. 57, p. 83-89, 2014.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 59, p. 426–435, 2002.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 592–605, 2013.

STEELANDT, J.; SALMON, D.; GILBERT, E.; ALMOUAZEN, E.; RENAUD, F. N. R.; ROUSSEL, L.; HAFTEK, M.; PIROT, F. Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 4467–4474, 2014.

SHARMA, S.; GANGULI, A. K. Spherical-to-Cylindrical Transformation of Reverse Micelles and Their Templating Effect on the Growth of Nanostructures. *J. Phys. Chem. B*, v.118, p. 4122–4131, 2014.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. The Effect of Tissue Inhibitors on the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles and Photodynamic Therapy. *JOE*, v. 38, p. 1275-1278, 2012.

TAN, H.; MA, R.; LIN, C.; LIU, Z.; TANG, T. Quaternized Chitosan as an Antimicrobial Agent: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action and Biomedical Applications in Orthopedics. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, p. 1854-1869, 2013.

TEWA-TAGNE, P.; GHANIA DEGOBERT, G.; BRIANÇON, S.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; LANTERI, P.; FESSI, H. Spray-drying Nanocapsules in Presence of Colloidal Silica as Drying Auxiliary Agent: Formulation and Process Variables Optimization Using Experimental Designs. *Pharmaceutical Research*, v. 24, p. 650-661, 2007.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 30, p. 124–135, 2007.

THE EUROPEAN COMMISSION, COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Official Journal of the European Union. L 275/38, 20.10.2011.

THANH, N. T. K.; GREEN, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, v. 5, p. 213-230, 2010.

UPTON, A.; KIRBY, K. A.; CARPENTER, P.; BOECKH, M.; MARR, K. A. Invasive Aspergillosis following Hematopoietic Cell Transplantation: Outcomes and Prognostic Factors Associated with Mortality. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p.531–40, 2007.

VALENTE, L.; DEL VALLE, L. J.; CASAS, M. T.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGGALÍ, J.; MARCHISIO, D. Nanospheres and nanocapsules of amphiphilic copolymers constituted by methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate and hexadecyl cyanoacrylate units. *eXPRESS Polymer Letters*, v.7, p.2–20, 2013.

Vehring, R.; Foss, W. R.; Lechuga-Ballesteros, D. Particle formation in spray drying. *Aerosol Science*, v. 38, p. 728 – 746, 2007.

Wayne Rasband. ImageJ 1.48 v, National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij> java 1.6.0\_20 (64 bit), Estados Unidos, 1997.

WANG, X.F.; ZHANG, S. L.; ZHU, L. Y.; XIE, S. Y.; DONG, Z.; WANG, Y.; ZHOU, W. Z. Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo. *The Veterinary Journal*, v. 191, p.115–120, 2012.

Wei, D.; Sun, W.; Qian, W.; Ye, Y.; Ma, X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 2375–2382, 2009.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 26, p.159-169, 2001.

WOLF, R.; ORNI-WASSERLAUF, R. A century of the synthesis of dapsone: its anti-infective capacity now and then. *International Journal of Dermatology*, v. 39, p. 779-783, 2000.

Wozel, G.; Blasum, C. Dapsone in dermatology and beyond. *Arch Dermatol Res*, v. 306, p. 103–124, 2014.

YOUSAF, A. M.; KIM, D. W.; OH, Y. K.; YONG, C. S.; KIM, J. O.; CHOI, H. G. Enhanced oral bioavailability of fenofibrate using polymeric nanoparticulated systems: physicochemical characterization and in vivo investigation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p.1819–1830, 2015.

ZIANI, K.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO, M.; MATÉ, J. I. Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 2309–2314, 2009.

ZOHRI, M.; ALAVIDJEH, M. S.; HARIRIAN, I.; ARDESTANI, M. S.; EBRAHIMI, S. E. S.; SANI, H. T.; SADJADI, S. K. A Comparative Study Between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Raw and Pasteurized Milk Samples. *Probiotics & Antimicro. Prot*, v. 2, p.258–266, 2010.

ZUIDEMA, J.; HILBERS-MODDERMAN, E.S.M.; MERKUS, F. W. H. M. Clinical Pharmacokinetics of Dapsone. *Clinical Pharmacokinetics*, v.11, p. 299-315, 1986.

ZHANG, L.; PORNATTANANANGKUL, D.; HU, C. M. J.; HUANG, C. M. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 585-594, 2010.

ZHAO, Y.; ZHANG, J.; WANG, Q.; LI, W.; LI, J.; HAN, B.; WU, Z.; ZHANG, K.; LI, Z. Cylindrical-to-Spherical Shape Transformation of Lecithin Reverse Micelles Induced by CO<sub>2</sub>. *Langmuir*, v.26, p. 4581-4585, 2010.

ZHOU, C.; WANG, M.; ZOU, K.; CHEN, J.; ZHU, Y.; DU, J. Antibacterial Polypeptide-Grafted Chitosan-Based Nanocapsules As an “Armed” Carrier of Anticancer and Antiepileptic Drugs. *ACS Macro Lett*, v.2, p. 1021–1025, 2013.

ZHONG, Z.; CHEN, R.; XING, R.; CHEN, X.; LIU, S.; GUO, Z.; JI, X.; WANG, L.; LIA, P. Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of chitosan. *Carbohydrate Research*, v. 342, p.2390–2395, 2007.







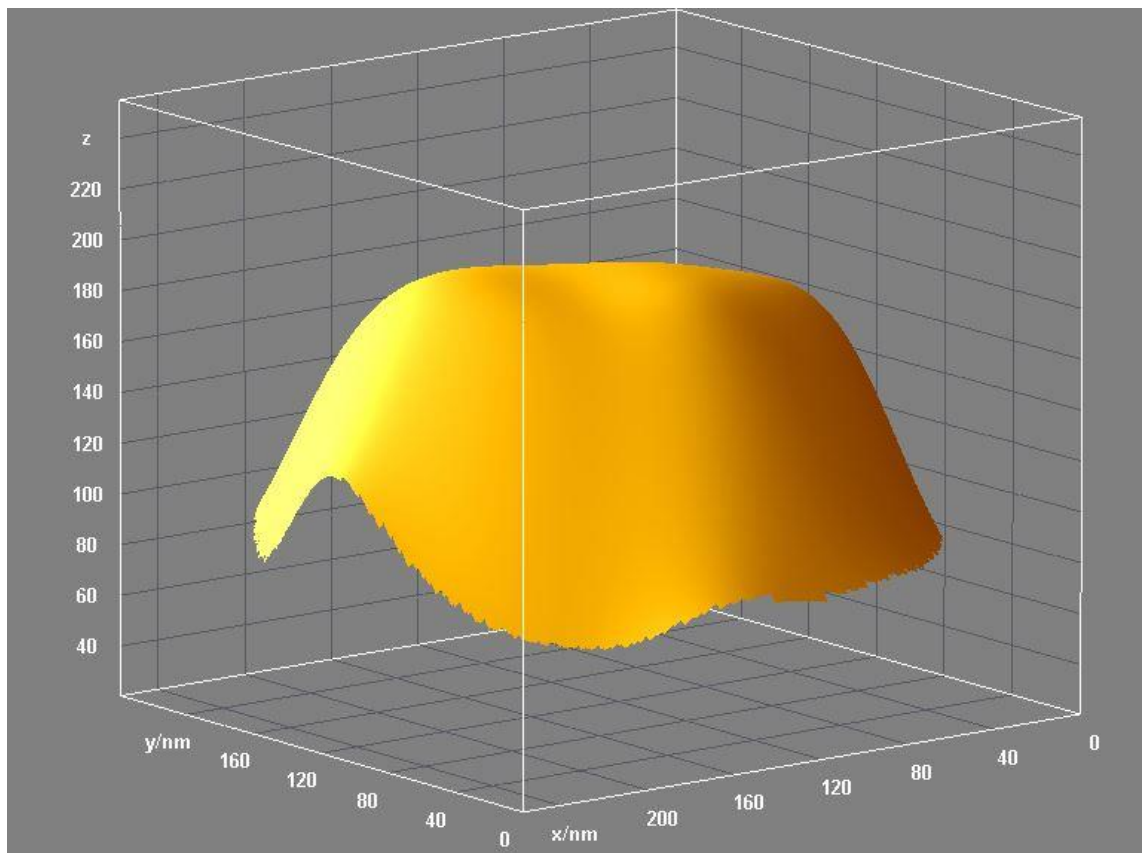


Figura 1: Plot interativo da superfície em 3D da nanocápsula de núcleo lipídico (LNC).

Spectrum: LNC.xls							A
El	AN	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]	
C	6	K-series	73,04	73,04	79,63	10,36	
O	8	K-series	22,33	22,33	18,27	4,61	
P	15	K-series	2,40	2,40	1,01	0,14	
Al	13	K-series	2,23	2,23	1,08	0,20	
Total:			100,00	100,00	100,00		

Spectrum: LNC-CS.xls							B
El	AN	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]	
C	6	K-series	74,98	74,98	79,76	11,69	
O	8	K-series	19,26	19,26	15,38	5,49	
N	7	K-series	4,96	4,96	4,52	3,39	
P	15	K-series	0,80	0,80	0,33	0,08	
Total:			100,00	100,00	100,00		

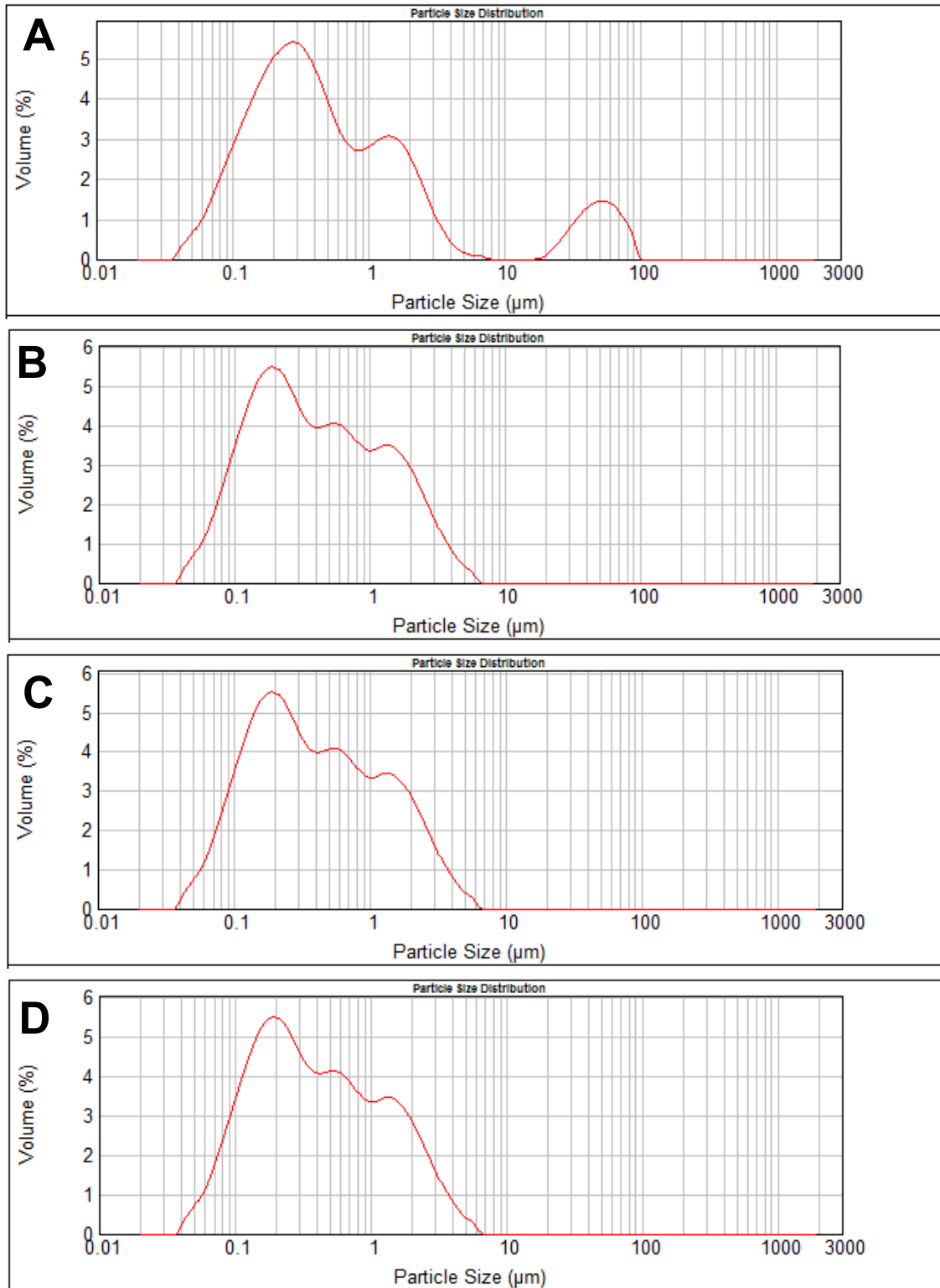
  

Spectrum: DAP-LNC.xls							C
El	AN	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]	
C	6	K-series	69,21	69,21	75,46	7,69	
O	8	K-series	28,97	28,97	23,71	3,63	
Al	13	K-series	1,02	1,02	0,50	0,08	
P	15	K-series	0,79	0,79	0,33	0,06	
Total:			100,00	100,00	100,00		

Spectrum: DAP-LNC-CS.xls							D
El	AN	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]	
C	6	K-series	69,08	69,08	74,88	7,64	
O	8	K-series	27,27	27,27	22,19	3,43	
N	7	K-series	2,75	2,75	2,56	0,67	
P	15	K-series	0,89	0,89	0,37	0,06	
Total:			100,00	100,00	100,00		

Figura 2: Spectrum das Microanálise química elemental: a) LNC; b) LNC-CS; c) DAP-LNC e d) DAP-LNC-CS.



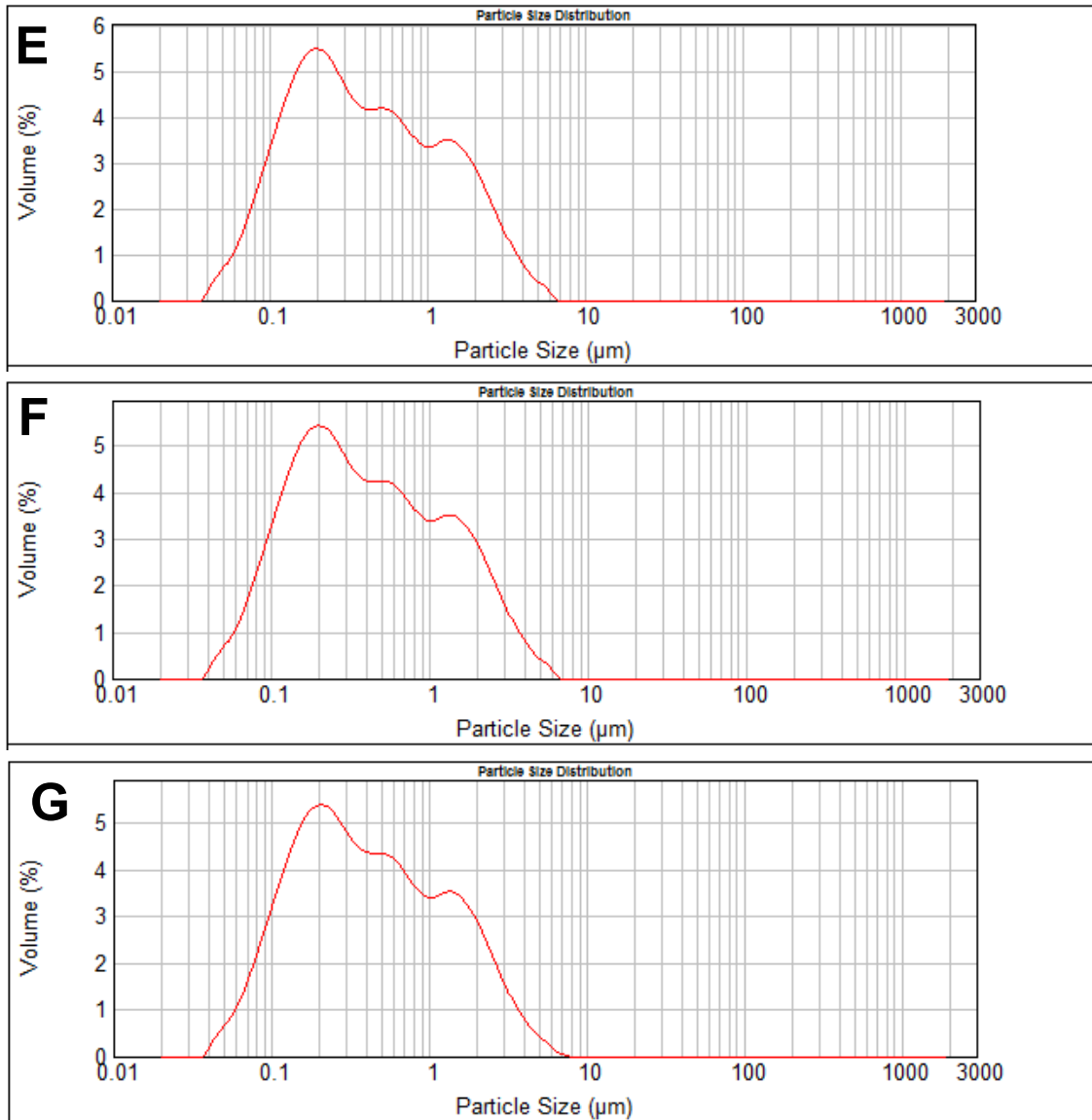
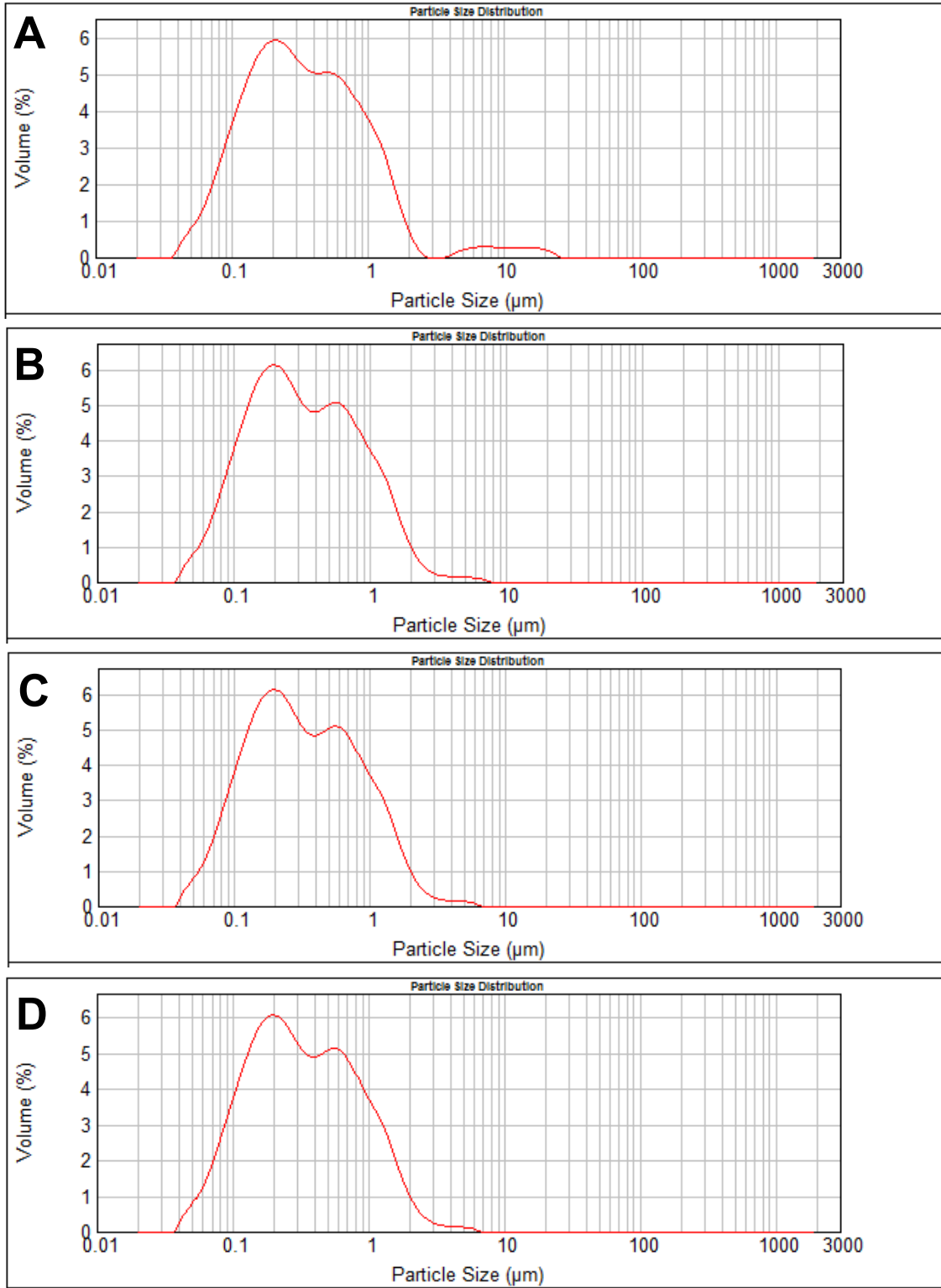


Figura 3: Desaglomeração das partículas por volume ( $\mu\text{m}$ ) da formulação DAP-LNC-CS seca com 1% de leucina. a) tempo 0; b) 5 min; c) 10 min; d) 15 min; e) 20 min; f) 25 min e g) 30 min.



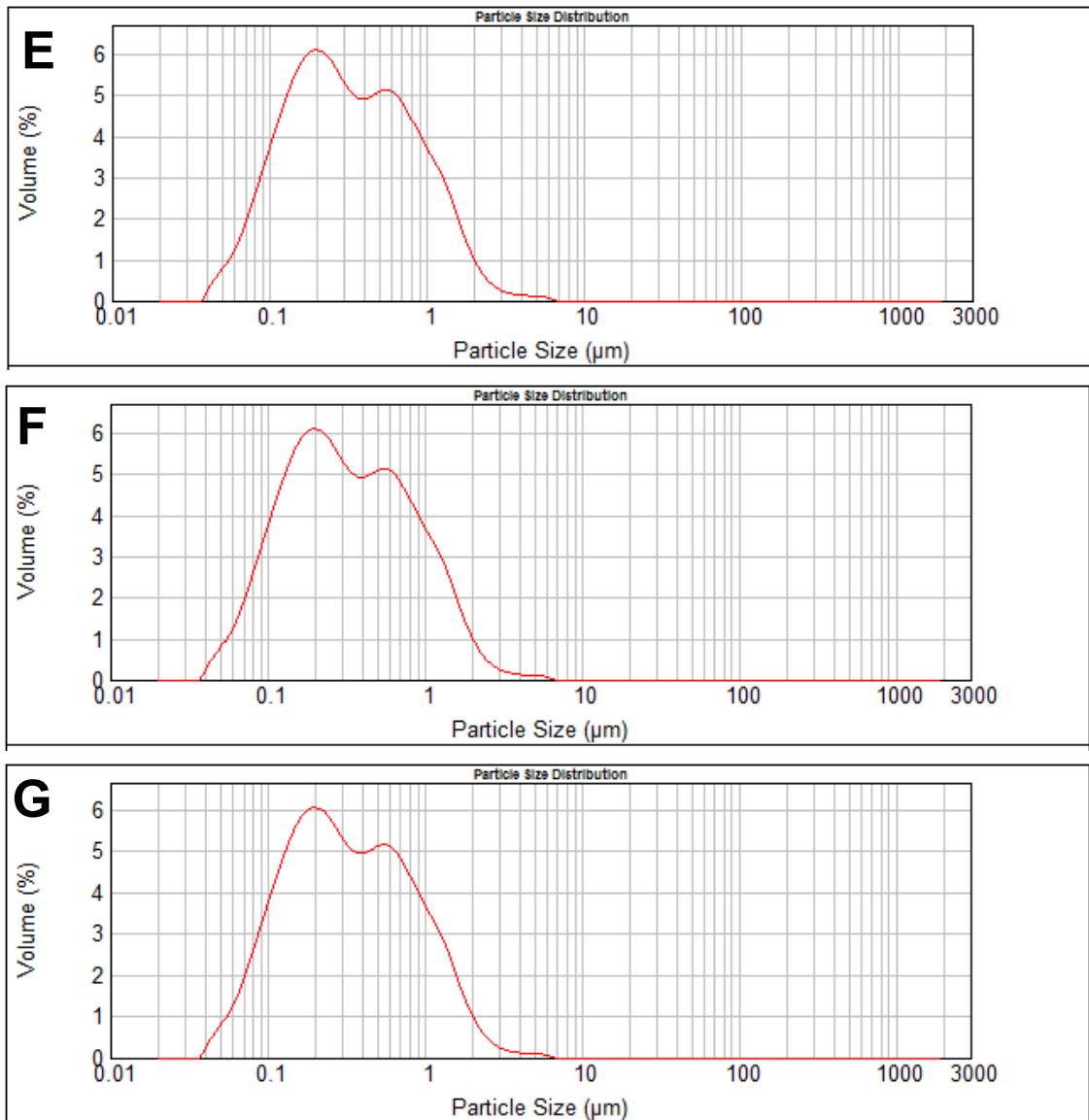
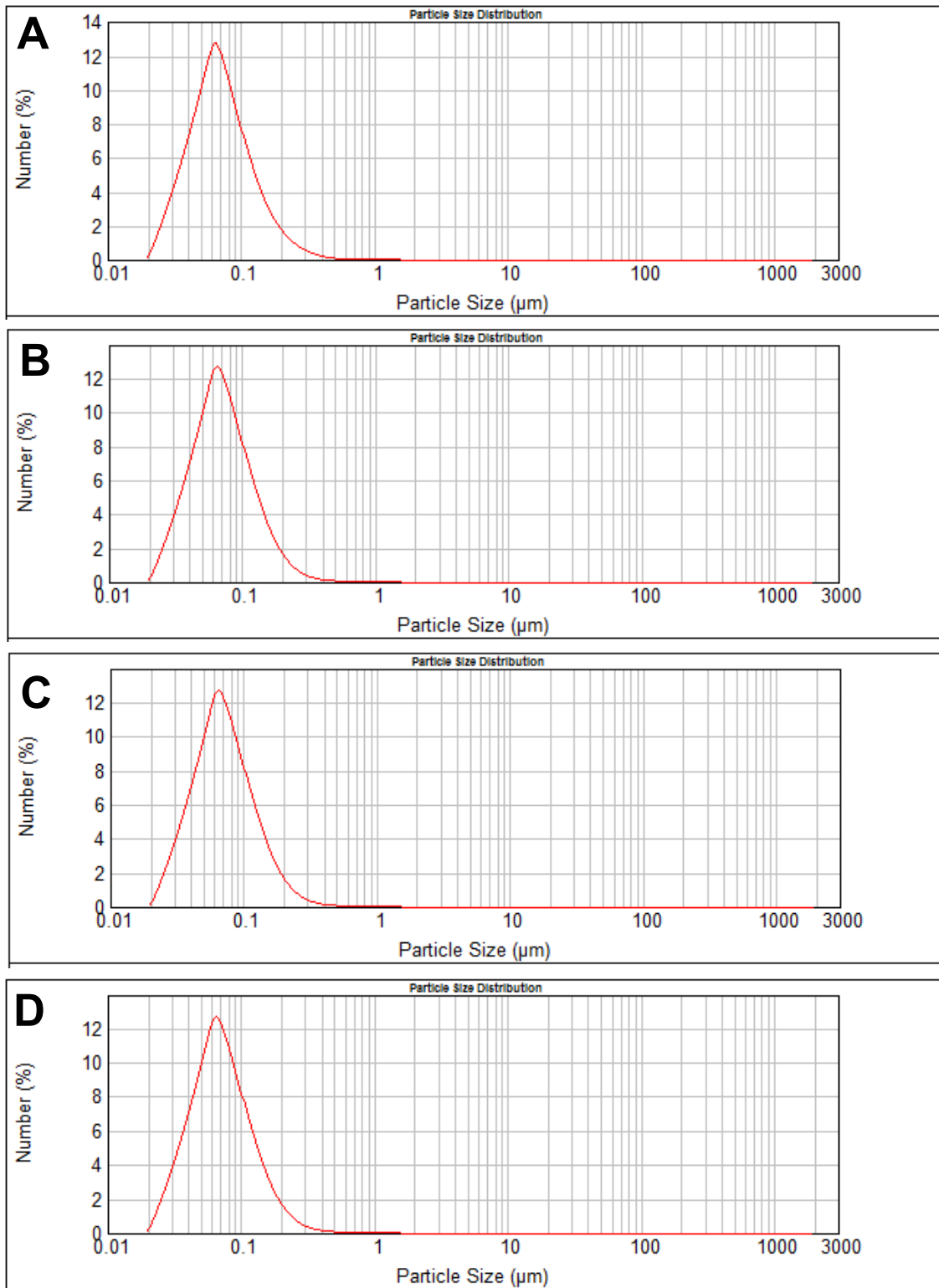


Figura 4: Desaglomeração das partículas por volume ( $\mu\text{m}$ ) da formulação de DAP-LNC-CS seca com 2% de leucina. a) tempo 0; b) 5 min; c) 10 min; d) 15 min; e) 20 min; f) 25 min e g) 30 min.



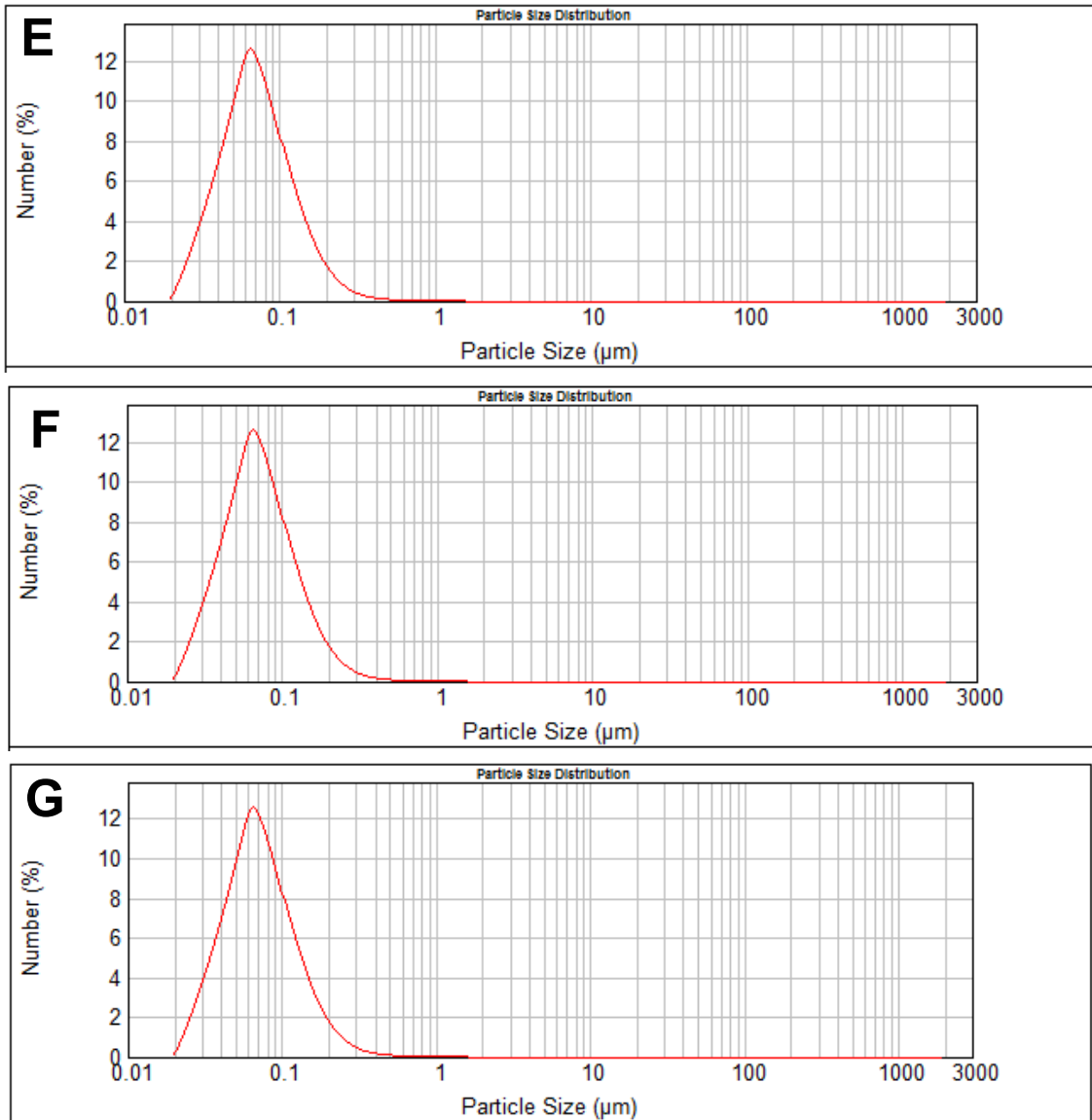
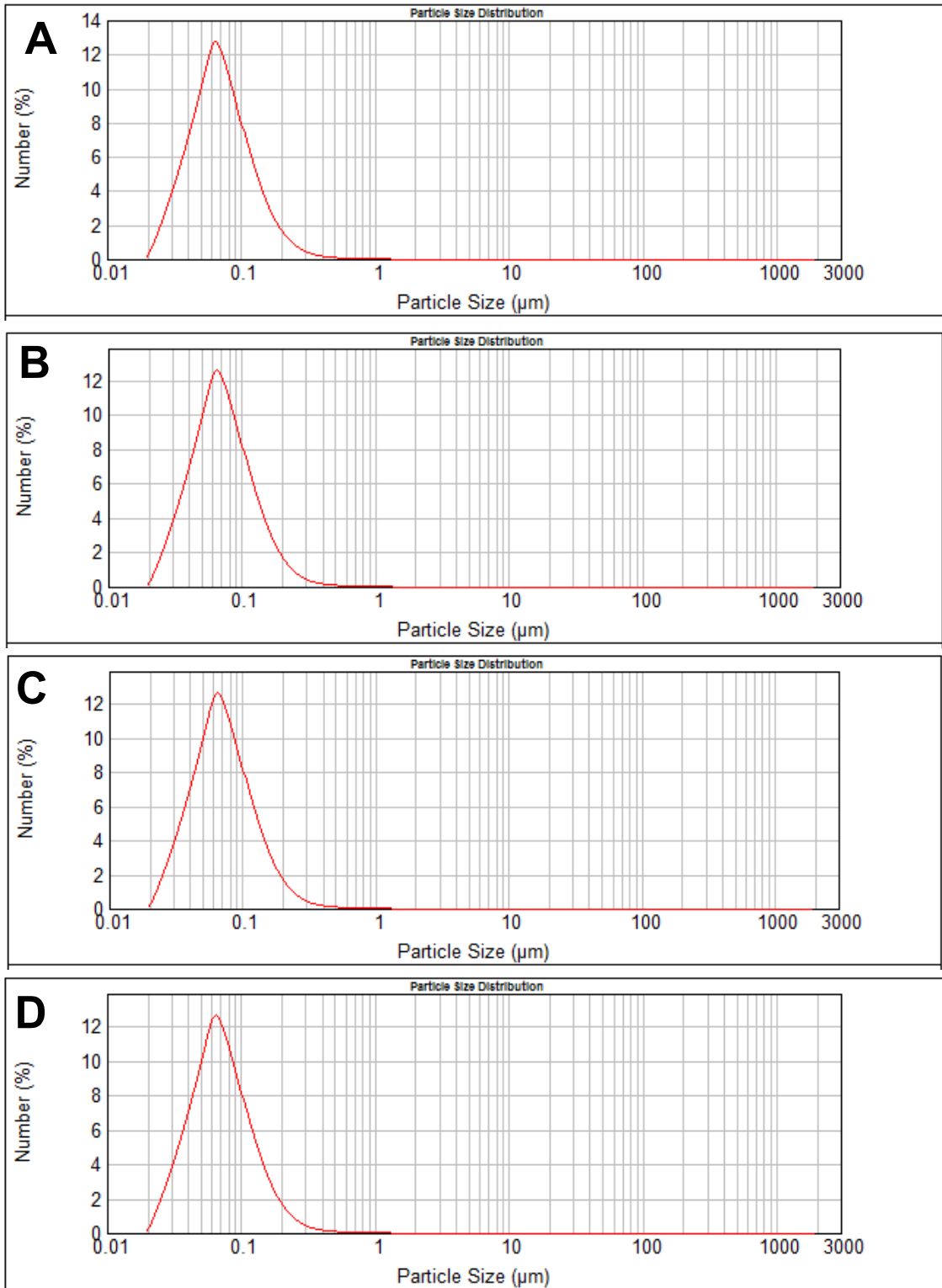


Figura 5: Desaglomeração das partículas por número ( $\mu\text{m}$ ) da formulação de DP-LNC-CS seca com 1% de leucina. a) tempo 0; b) 5 min; c) 10 min; d) 15 min; e) 20 min; f) 25 min e g) 30 min.





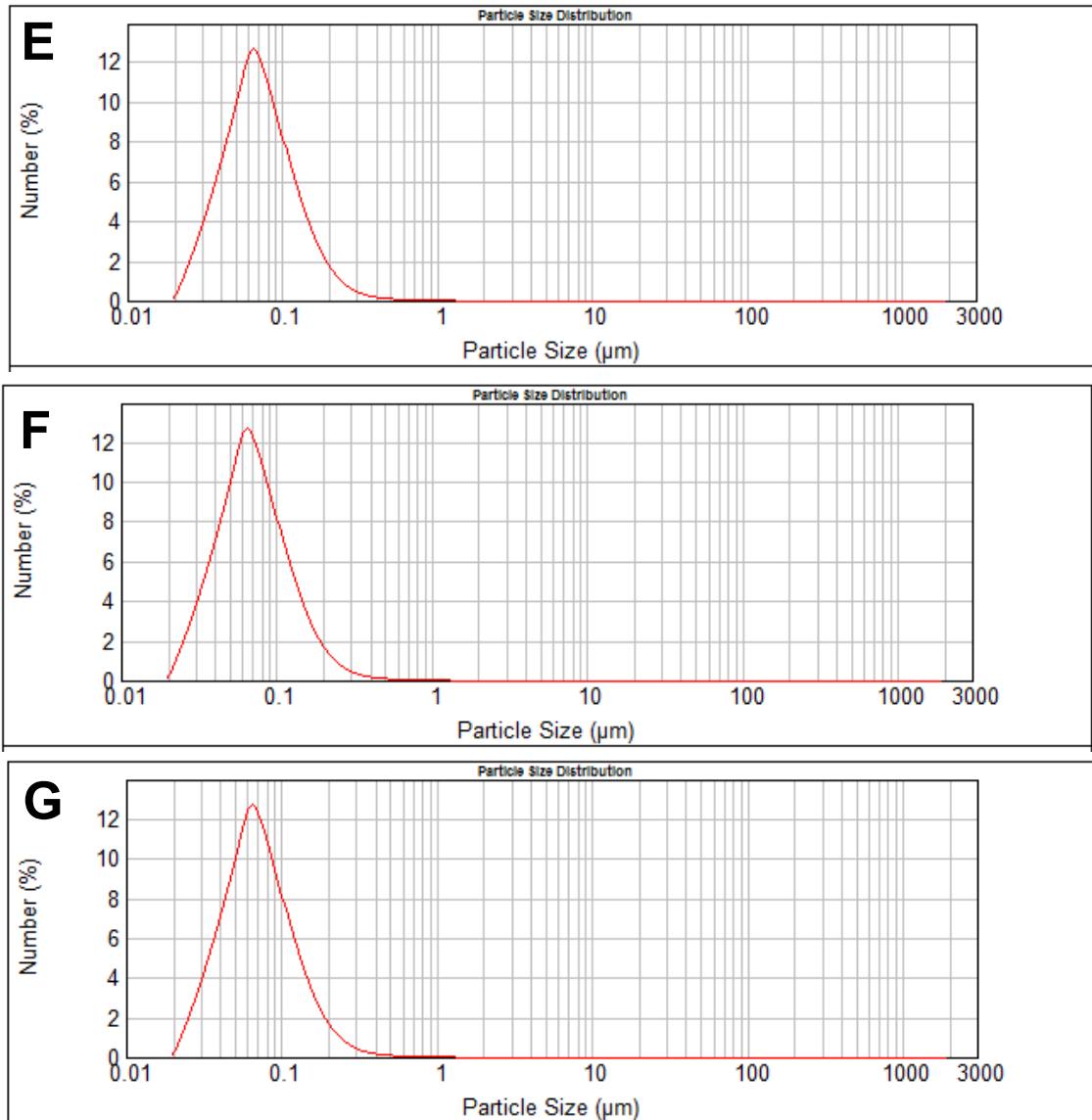


Figura 6: Desaglomeração das partículas por número ( $\mu\text{m}$ ) da formulação de DAP-LNC-CS seca com 2% de leucina. a) tempo 0; b) 5 min; c) 10 min; d) 15 min; e) 20 min; f) 25 min e g) 30 min.