

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES CONTENDO IMIQUIMODE
VISANDO UM APRIMORAMENTO DA TERAPIA TÓPICA PARA O
CARCINOMA CUTÂNEO**

Franciele Aline Bruinsmann

Porto Alegre, junho de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES CONTENDO IMIQUIMODE
VISANDO UM APRIMORAMENTO DA TERAPIA TÓPICA PARA O
CARCINOMA CUTÂNEO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
por **Franciele Aline Bruinsmann** para
aprovação em disciplina de **trabalho de
conclusão de curso**.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisquaski Guterres
Co-orientadora: Dra. Renata Vidor Contri

Porto Alegre, junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sílvio e Zélia, e minha irmã, Francine, pela força e incentivo em todos os momentos.

À Prof^ª. Dr^ª Sílvia Stanisçuaski Guterres, pela oportunidade e orientação;

A Dr^ª Renata Vidor Contri, pela co-orientação, dedicação e ensinamentos durante o desenvolvimento do TCC.

A Dr^ª. Cristina de Garcia Venturini, pelo apoio, ensinamentos e auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos.

RESUMO

Sistemas nanoestruturados têm atraído a atenção na área farmacêutica devido o seu potencial como carreadores de fármacos. O imiquimode é um derivado aminoimidazoquinolina, que possui propriedades imunomoduladoras, aprovado para o tratamento de carcinoma basocelular. Nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparados por deposição interfacial de polímero pré-formado e homogeneização à alta pressão, respectivamente. Em seguida, as formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula (difratometria de laser e espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta (mobilidade eletroforética), pH (potenciometria), viscosidade (viscosimetria rotacional), morfologia (microscopia eletrônica de transmissão), teor de fármaco e eficiência de encapsulação (CLAE-UV), estabilidade física (retroespalhamento de luz), e liberação do imiquimode *in vitro* (diálise direta). Após, um estudo de penetração cutânea *in vitro*, utilizando células de Franz e pele de abdômen suíno, objetivou identificar o nanocarreador com melhor perfil visando um aprimoramento da terapia tópica. As formulações apresentaram diâmetro nanométrico [D[4,3] de 279 ± 2 nm (NCL) e 153 ± 4 nm (CLN) e diâmetro médio de 206 ± 6 nm (NCL) e 177 ± 2 nm (CLN)] e boa homogeneidade de tamanho. Os valores de potencial zeta encontrados foram de $-12,1 \pm 1,7$ mV (NCL) e $-12,7 \pm 3,6$ mV (CLN). As suspensões de nanopartículas apresentaram valores de pH adequados para uso cutâneo [$6,24 \pm 0,08$ (NCL) e $6,0 \pm 0,02$ (CLN)] bem como valores de viscosidade similares entre as nanopartículas ($0,001265 \pm 0,007$ Pa.s para NCL e $0,001475 \pm 0,021$ Pa.s para CLN). A análise morfológica indicou a presença de estruturas esféricas, relativamente similares entre si. O teor de fármaco obtido foi $970 \pm 0,02$ µg/mL para NCL e $980 \pm 0,03$ µg/ml para CLN, correspondentes a 97% e 98%, respectivamente, com alta eficiência de encapsulação (acima de 97%). As formulações apresentaram-se fisicamente estáveis à temperatura de 25° C. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada comparando os perfis de liberação do fármaco livre, NCL e CLN, os quais liberaram $101,4 \pm 0,8\%$, $79,0 \pm 1,1\%$, $55,83 \pm 2,37\%$, respectivamente, em 180 minutos, de forma que ambas formulações de nanopartículas foram capazes de controlar a liberação do fármaco. O estudo de permeação demonstrou que, em comparação à CLN, a NCL levou a maior retenção do fármaco nas camadas da pele, demonstrando ser um nanocarreador adequado para aplicação de imiquimode na pele. **Palavras-chave:** 1. Imiquimode; 2. Nanocápsula de núcleo lipídico; 3. Carreador lipídico nanoestruturado; 4. Permeação cutânea.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	11
3. Revisão Bibliográfica.....	12
3.1 Nanopartículas poliméricas.....	12
3.2 Nanopartículas lipídicas.....	13
3.3 Caracterização das nanopartículas.....	14
3.4 Pele e aplicação cutânea de nanopartículas.....	15
3.5 Óleos de origem vegetal para aplicação cutânea.....	16
3.6 Carcinoma cutâneo e Imiquimode	17
4. Parte Experimental.....	20
4.1 Materiais.....	20
4.2 Método analítico para quantificação do imiquimode.....	20
4.3 Seleção do óleo vegetal para compor as nanopartículas.....	21
4.3.1 Efeito dos óleos nos filmes poliméricos de poli (ϵ -caprolactona).....	21
4.3.2 Concentração de saturação do imiquimode em diferentes óleos vegetais	21
4.4 Preparação das nanopartículas.....	21
4.4.1 Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico.....	21
4.4.2 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	22
4.5 Caracterização físico-química das formulações.....	22
4.5.1 Diâmetro e distribuição de tamanho de partícula.....	22
4.5.2 Potencial zeta.....	23
4.5.3 pH.....	23
4.5.4 Viscosidade.....	23
4.5.5 Morfologia.....	23
4.5.6 Teor de fármaco e Eficiência de encapsulação.....	23
4.5.7 Estabilidade física.....	24
4.5.8 Liberação <i>in vitro</i>	24
4.6 Estudo do perfil de penetração/permeação do imiquimode a partir das nanopartículas.....	25
4.6.1 Preparação e estocagem das membranas.....	25
4.6.2 Montagem das células de difusão do tipo Franz, <i>in vitro</i>	25

4.6.3. Técnica do <i>tape stripping</i>	26
4.6.4 Técnica de retenção cutânea.....	26
4.7 Análise estatística.....	26
5. Resultados e Discussão.....	27
5.1 Seleção do óleo vegetal para compor as nanopartículas	27
5.2 Caracterização das nanopartículas.....	28
5.2.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho.....	29
5.2.2 Potencial Zeta.....	30
5.2.3 pH.....	30
5.2.4 Viscosidade.....	30
5.2.5 Morfologia.....	30
5.2.6 Teor de Fármaco e Eficiência de encapsulação.....	31
5.2.7 Estabilidade física.....	32
5.2.8 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	33
5.3 Estudo do perfil de penetração/permeação do imiquimode a partir das nanopartículas.....	36
6.Conclusão.....	39
7.Referências Bibliográficas.....	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura química do imiquimode.....	18
FIGURA 2 Perfil de inchamento do polímero (PCL).....	27
FIGURA 3 Distribuição granulométrica dos nanocarreadores.....	29
FIGURA 4 Fotomicrografias dos nanocarreadores.....	31
FIGURA 5 Perfil de retro-espalhamento do NCL e CLN.....	32
FIGURA 6 Perfil de liberação do imiquimode.....	33
FIGURA 7 Concentrações de IMQ nos diferentes compartimentos da pele.....	36
FIGURA 8 Concentrações de imiquimode após 24 horas, no meio receptor.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Concentração de saturação do IMQ em diferentes óleos vegetais.....	28
TABELA 2 Distribuição granulométrica dos nanocarreadores.....	29
TABELA 3 Modelagem dos perfis de liberação do IMQ.....	35

1. Introdução

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem em comum a multiplicação desordenada e rápida de células no corpo humano, invadindo tecidos e órgãos. Nas últimas décadas, a incidência de câncer na população mundial vem aumentando, sendo a segunda principal causa de óbito no Brasil, atrás apenas das doenças do aparelho circulatório (Rede integrada de indicadores para a saúde). O câncer de pele é comumente dividido em não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma escamoso) e melanoma. O carcinoma basocelular é um tumor epitelial maligno, que surge de células pluripotentes na camada basal da epiderme. É o câncer mais frequente em humanos e causado, principalmente, pela radiação UVB (Roewert *et al.*, 2007). Os métodos não cirúrgicos para o tratamento do carcinoma basocelular são adequados a grande parte dos pacientes devido a potencial desconfiguração, redução na função do órgão e aos riscos inerentes de uma cirurgia (Neville *et al.*, 2007). O imiquimode é um fármaco imunomodulador aprovado para o tratamento de carcinoma basocelular, verrugas genitais, molusco contagioso, xeroderma pigmentoso, ceratose actínica e doença de Bowen (Wagstaff e Perry, 2007). O imiquimode liga-se aos receptores Toll-like (TLR-7 e TLR-8) da superfície celular e ativa o sistema imune via secreção de citocinas e ativação imunidade mediada por células Th-1 (Neville *et al.*, 2007).

Sistemas nanoestruturados vêm recebendo grande atenção devido a necessidade de otimizar a ação terapêutica de fármacos, incluindo os antiproliferativos, no organismo. Nanopartículas poliméricas são utilizadas como vetores para carrear o fármaco diretamente ao sítio-alvo, dessa forma minimizando os efeitos adversos e a possível toxicidade que substâncias bioativas podem apresentar em tecidos ou órgãos saudáveis. Ainda, é possível aumentar a biodisponibilidade de fármacos e controlar sua liberação quando associados a nanopartículas (Soppimath *et al.*, 2001). As nanocápsulas poliméricas consistem em uma estrutura vesicular com um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso (Fessi *et al.*, 1989) ou lipídico, constituído por um lipídeo sólido disperso em um lipídeo líquido (Muller *et al.*, 2001). No começo dos anos 90, foram desenvolvidas as nanopartículas lipídicas sólidas, derivadas de emulsões O/A por substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal. Atualmente, já se conta com a segunda geração de nanopartículas lipídicas, representada pelos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), os quais foram desenvolvidos a partir da mistura de um

lipídeo sólido com um lipídeo líquido, a qual também se apresenta sólida à temperatura ambiente (Müller *et al.*, 2007).

Em vista do exposto, o objetivo do presente trabalho foi preparar e caracterizar sistemas nanoestruturados poliméricos e lipídicos contendo imiquimode visando o desenvolvimento de uma formulação promissora para o tratamento do carcinoma cutâneo.

Após a descrição dos objetivos deste trabalho, encontra-se a revisão do tema e na sequência a parte experimental, os resultados apresentados juntamente com a discussão e por fim, a conclusão e as referências bibliográficas.

2. Objetivos

2.1 Geral

Preparar e caracterizar sistemas nanoestruturados poliméricos e lipídicos contendo imiquimode visando o desenvolvimento de uma formulação promissora para o tratamento do carcinoma cutâneo.

2.2 Específicos

- Avaliar aspectos de pré-formulação incluindo a escolha do componente oleoso das nanopartículas e avaliação da estrutura do polímero em contato com os óleos propostos.
- Preparar nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) contendo imiquimode e caracterizar o sistema quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, pH, viscosidade, morfologia, teor de fármaco e eficiência de encapsulação, estabilidade física e liberação do imiquimode *in vitro*.
- Preparar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo imiquimode e caracterizar o sistema quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, pH, viscosidade, morfologia, teor de fármaco e eficiência de encapsulação, estabilidade física e liberação do imiquimode *in vitro*.
- Estudar a penetração/permeação cutânea do fármaco *in vitro* a partir das nanopartículas lipídicas e poliméricas, visando a escolha da formulação mais adequada para aplicação cutânea de imiquimode.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Nanopartículas poliméricas

Sistemas nanocarreadores poliméricos têm atraído grande atenção no campo das ciências farmacêuticas por oferecerem um apropriado sistema para a liberação de vários agentes terapêuticos em áreas específicas do corpo, objetivando aumentar o índice terapêutico e diminuir efeitos adversos (Esmaeili *et al.*, 2008; Semete *et al.*, 2010; Caminade *et al.*, 2010; Licciardi *et al.*, 2010).

Nanopartículas poliméricas é um termo genérico para referir-se à nanocápsulas e nanoesferas, as quais são carreadores com um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (Jager *et al.*, 2007) e uma matriz polimérica (Pohlmann *et al.*, 2007) respectivamente. As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores, por proteger a substância ativa nela incorporada frente à degradação enzimática e imunológica, aumentar a especificidade de ação, desta forma aumentando a atividade terapêutica de muitas substâncias, resultando em doses terapêuticas menores, com redução dos efeitos tóxicos (Cruz *et al.*, 2006; Schaffazick *et al.*, 2005; Schaffazick *et al.*, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Um grande número de fármacos apresenta pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso, fatores que podem originar problemas no desenvolvimento de formulações. Neste sentido, as nanopartículas poliméricas podem proteger moléculas lábeis e moléculas com problemas de solubilidade (Legrand *et al.*, 1999).

Em 1989, Fessi e colaboradores propuseram o método baseado na deposição do polímero pré-formado. Este método consiste em dissolver o polímero, óleo, estabilizador (tensoativo de baixo EHL) e substância ativa em um solvente miscível em água. Essa fase orgânica é vertida em uma fase aquosa contendo estabilizador hidrofílico (tensoativo de alto EHL). As nanopartículas são originadas espontaneamente pela rápida difusão do solvente que é posteriormente eliminado da suspensão através da evaporação sob pressão reduzida. Este método produz nanopartículas com elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos.

Para a obtenção de nanocápsulas através do método de deposição interfacial as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, componente oleoso e tensoativos. Os polímeros mais utilizados são poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-glicolideo) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e ainda os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (Schaffazick *et al.*, 2003). Os óleos mais

utilizados são os ésteres de ácidos graxos, Mygliol 810[®] e 812[®] e misturas de triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa (Mosqueira *et al.*, 2000). Estas formulações exigem também o uso de uma associação de tensoativos, um de elevado EHL (Tween 80[®]) e outro de baixo EHL (monoestearato de sorbitano) (Mu *et al.*, 2004) ou ainda a presença de fosfolipídios (Mundargi *et al.*, 2008) ou de polímeros oxigenados como PEG e os poloxameros (Zhang *et al.*, 2008). A presença dos tensoativos confere maior viscosidade ao sistema após a evaporação do solvente, aumentando a estabilidade do mesmo por prevenir a agregação com o passar do tempo.

3.2 Nanopartículas lipídicas

Baseadas nas emulsões para nutrição parenteral, introduzidas na rotina clínica nos anos 50, emulsões O/A contendo fármacos foram desenvolvidas (Müller *et al.*, 2000). No entanto, com estes sistemas a possibilidade de se alcançar uma liberação controlada da substância veiculada é limitada devido ao estado líquido do carreador. Assim, a utilização de um lipídeo sólido em substituição ao óleo, mostrou-se como uma estratégia interessante para o controle da liberação, uma vez que a mobilidade do fármaco poderia ser consideravelmente reduzida (Mehnert e Mäder, 2001).

Desta forma, foram desenvolvidas no começo dos anos 90 as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), derivadas de emulsões O/A por simples substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (Müller *et al.*, 2007). Atualmente, já se conta com a segunda geração de nanopartículas lipídicas, representada pelos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), os quais foram desenvolvidos a partir da blenda de um lipídeo sólido com um lipídeo líquido, a qual também se apresenta sólida à temperatura ambiente (Müller *et al.*, 2007). A vantagem da segunda geração é a maior capacidade de carga de ativos em comparação às NLS e, ainda, firme inclusão do ativo dentro da matriz da partícula durante períodos de estocagem (Stecová *et al.*, 2007).

Dentre os métodos preconizados para a preparação de dispersões nanométricas de lipídeos sólidos, a homogeneização a alta pressão (HAP) é considerada a técnica mais efetiva em produzir partículas com tamanho reduzido, geralmente inferior a 500 nm, além de adequada distribuição de tamanho (Souto *et al.*, 2004). Em contraste com outras técnicas, a HAP caracteriza-se pela possibilidade de produção em grande escala, facilitada pela ampla variedade de tamanho dos homogeneizadores (Mühlen *et al.*, 1998).

A produção de NLS inicia com a incorporação do fármaco/ativo cosmético na massa lipídica fundida, que é em seguida dispersada em uma solução aquosa do tensoativo aquecida à mesma temperatura da fase lipídica. A pré-emulsão obtida é submetida à ação de um homogeneizador de alta pressão, etapa que pode ser repetida diversas vezes. O produto resultante é uma nanoemulsão O/A, devido ao estado líquido do lipídeo. Contudo, após o resfriamento, ocorre a recristalização do lipídeo, levando à formação de nanopartículas lipídicas com matriz sólida (Mehnert e Mäder, 2001). A preparação de CLN é idêntica à de NLS, variando-se apenas os materiais de partida, conforme discutido anteriormente (Müller *et al.*, 2007).

3.3 Caracterização das nanopartículas

O planejamento de nanocarreadores contendo fármacos envolve uma série de estudos de pré-formulação visando a obtenção de formulações realmente nanotecnológicas (que apresentam tamanho nanométrico de partículas), com adequada eficiência de encapsulação do fármaco, estabilidade físico-química e biocompatibilidade. O desenvolvimento destes sistemas contemplando uma detalhada etapa de caracterização físico-química com métodos analíticos otimizados e validados é fundamental para a otimização da ação terapêutica de substâncias bioativas nanoencapsuladas (Schaffazick *et al.*, 2003; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

A distribuição *in vivo* e conseqüentemente a vetorização de nanopartículas é influenciada pelo diâmetro, carga de superfície, composição da superfície e hidrofobicidade. Parâmetros como diâmetro e distribuição de diâmetro são de grande importância para determinar a interação da nanopartícula com a membrana celular e a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas (Brannon–Peppas e Blanchette, 2004). Paralelamente, a determinação da carga de superfície é importante para verificar uma possível formação de *cluster*, aderência ou interação com a membrana celular (Feng, 2004). Nanopartículas com carga de superfície positiva apresentam maior capacidade de penetração intracelular (Shenoy *et al.*, 2005). A distribuição *in vivo* dos nanocarreadores também está relacionada ao tempo de permanência na corrente sangüínea, como conseqüência das características de superfície das partículas. Devido à característica hidrofóbica da superfície de algumas nanopartículas, o sistema fagocitário mononuclear, retira-as da circulação rapidamente. O revestimento da superfície da partícula com polímeros hidrofílicos é uma ótima alternativa para prolongar a permanência de

nanopartículas poliméricas no sangue (Li e Huang, 2010; Mainardes *et al.*, 2010; Sridaeng *et al.*, 2010).

Diante destes aspectos, é imprescindível o emprego de diferentes métodos para a caracterização de nanopartículas, como forma de atestar a sua característica nanotecnológica, avaliar a sua estabilidade físico-química e prospectar o seu comportamento *in vivo*. Entre os métodos analíticos mais empregados estão a difração de laser, espalhamento de luz dinâmico, espalhamento múltiplo de luz, mobilidade eletroforética e cromatografia líquida de alta eficiência.

3.4 Pele e aplicação cutânea de nanopartículas

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, apresentando uma área total de cerca de 2 m². Ela atua como uma barreira entre o organismo e o meio ambiente externo (Hadgraft, 2001). Além de revestir a superfície externa do corpo, protegendo-o, outras funções atribuídas a esse órgão são: proteção contra a radiação UV, manutenção da temperatura corporal, proteção física e de danos químicos, proteção a ataque microbiológico, funções sensoriais (Ribeiro, 2010).

A pele é composta principalmente de duas camadas a epiderme e a derme, além da camada subcutânea. Uma grande variedade de células diferentes está presente na pele, sendo considerada mais complexa do que o cérebro em relação a este aspecto. A epiderme é composta de vários lípidos, incluindo fosfolípidos, fosfatidilcolina, colesterol e triglicérides. Os principais tipos de células encontradas na epiderme são queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme é dividida em várias camadas, sendo a sua camada mais externa, o estrato córneo, responsável pela função de barreira da pele, devido à sua lipofilicidade e alta coesão entre as células. O estrato córneo é formado de corneócitos queratinizados incorporados em camadas lipídicas duplas. A derme é a camada mais próxima ao tecido subcutâneo, e que é composta por colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e fibroblastos. Esta camada é altamente vascularizada além de conter os anexos (glândulas sudoríparas e aparelho pilossebáceo) e leucócitos, adipócitos e mastócitos (Contri *et al.*, 2011).

A administração tópica de fármacos possui vantagens como baixíssimos efeitos sistêmicos e vetorização das substâncias à área lesada (Guterres *et al.*, 2007). Um importante desafio é determinar a forma precisa de como as substâncias penetram através

da pele e como diferentes formulações podem afetar este mecanismo (Morganti *et al.*, 2001).

As nanopartículas poliméricas, bem como os carreadores lipídicos nanoestruturados podem ser utilizados para a liberação de fármacos através da pele, esses sistemas nanoparticulados têm apresentado crescente interesse, no uso como veículos para administração tópica de fármacos por permitirem a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (Schaffazick *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2003; Cevc, 2004). Tanto a liberação imediata e a liberação sustentada têm sido relatadas para os sistemas nanoestruturados. Para as aplicações tópicas, essas duas características são interessantes, a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é interessante para substâncias ativas irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo (Jenning *et al.*, 2000).

3.5 Óleos de origem vegetal para aplicação cutânea

A diversidade de árvores na Amazônia pode variar entre 40 e 300 espécies diferentes por hectare. Entre as frutas e as plantas oleaginosas extraídas na Amazônia, muitas são excepcionalmente ricas em micronutrientes, particularmente em antioxidantes, como os carotenóides, antocianinas e outros polifenóis (Rosso e Mercadante, 2007). Os óleos vegetais podem ser extraídos a frio em primeira e única prensagem, como matérias primas de primeira qualidade. Estes óleos não passam por nenhum processo de refino e não têm adição de qualquer componente químico em sua fabricação, garantindo desta forma sua estrutura original e benefícios para a saúde que os ácidos graxos essenciais proporcionam (Godoy *et al.*, 1994).

O uso de óleos vegetais em produtos para aplicação cutânea tem sido amplamente valorizado, visto que são biocompatíveis e apresentam vantagens em relação aos cuidados e a proteção da pele. A atividade antioxidante já foi comprovada para diversos óleos vegetais, portanto, são capazes de reduzir a produção de radicais livres, gerados pelos raios UV e poluição atmosférica (Contri *et al.*, 2013).

Dentre os óleos vegetais para aplicação cutânea, o óleo de copaíba pode ser mencionado devido a sua ampla aplicação farmacológica destacando-se atividade antiinflamatória (Veiga *et al.*, 2007) e antineoplásica no tratamento de melanoma (Lima *et al.*, 2003) e carcinoma invasivo micropapilar (Ohsaki *et al.*, 1994). Além disso, o óleo de

copaíba pode substituir adequadamente corticóides tópicos no tratamento de dermatites, diminuindo prurido, dor, edema e calor (Minaglou e Bolcato, 2005). O óleo de copaíba é um exudado extraído do tronco das árvores do gênero *Copaifera*, provenientes da região tropical da América Latina (Veiga e Pinto, 2002). A produção do óleo varia entre 0 e 18 L por árvore, não havendo relação do relevo e do porte de árvore com a produção de óleo (Azevedo *et al.*, 2006).

3.6 Carcinoma cutâneo e Imiquimode

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem em comum a multiplicação desordenada e rápida de células no corpo humano, invadindo tecidos e órgãos. Nas últimas décadas, a incidência de câncer na população mundial vem aumentando, sendo a segunda principal causa de óbito no Brasil, atrás apenas das doenças do aparelho circulatório (Rede integrada de indicadores Para a saúde, 2014)

O câncer de pele é comumente dividido em não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma escamoso) e melanoma. O câncer de pele do tipo não melanoma é o tumor maligno mais comum em populações caucasianas e representa 96% de todos os casos de câncer de pele (Prado *et al.*, 2011). O câncer de pele do tipo não-melanoma é o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA). O número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2012 era 134.170, sendo 62.680 homens e 71.490 mulheres, de acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer publicada pelo INCA (2012).

O carcinoma basocelular é um tumor epitelial maligno, que surge de células pluripotentes na camada basal da epiderme. É o câncer mais frequente em humanos e causado, principalmente, pela radiação UVB (Roewert *et al.*, 2007). Geralmente, o crescimento desse tumor é lento e raramente apresenta metástase (Ishi, *et al.*, 2004). Muitas vezes sua localização e extensão oferecem dificuldades terapêuticas, essas dificuldades podem ser evidenciadas pelas diversas variedades existente no tratamento desse tipo de tumor (Festa Neto, 2002), entre elas excisão cirúrgica, curetagem e eletrocoagulação, aplicação de laser, terapia fotodinâmica, criocirurgia, interferon intralesional e quimioterapia (Festa Neto, 2001). Os métodos não cirúrgicos são adequados a grande parte dos pacientes devido a potencial desconfiguração, redução na função do órgão e aos riscos inerentes de uma cirurgia (Neville *et al.*, 2007).

Imiquimode é um derivado aminoimidazoquinolina e sua estrutura é mostrada na figura 1. É um fármaco imunomodulador aprovado para o tratamento de verrugas genitais, molusco contagioso, xeroderma pigmentoso, carcinoma basal, ceratose actínica e doença de Bowen (Wagstaff e Perry, 2007)

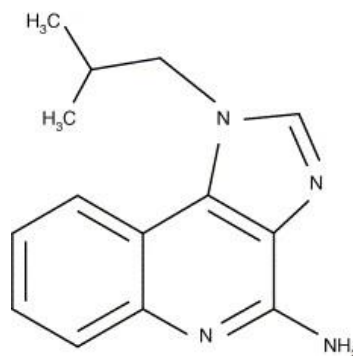


Figura 1. Estrutura química do imiquimode.

O imiquimode é um modificador da resposta imune que estimula tanto sistema imune inato como o adaptativo, resultando num aumento da função imune (Sauder, 2003). O imiquimode liga-se aos receptores Toll-like (TLR-7 e TLR-8) da superfície celular e ativa o sistema imune via secreção de citocinas, como IFN-g, IFN-a e IL-12. Estas citocinas estimulam a resposta imune T-helper tipo 1 (Th 1). A produção da resposta imune T-helper tipo 2 (Th-2) é inibida pelo imiquimode. Além disso, há uma alta regulação da atividade das células NK (*natural killers*) via indução da 2'5'oligoadenilato sintetase. A modulação da resposta imune controla tumores e cria um estado anti-viral capaz de controlar vírus. O imiquimode induz a migração de células de Langerhans para linfonodos regionais e aumenta a apresentação de antígenos às células T (Sauder, 2003)

É administrado por via tópica na forma de creme a 10 e 50 mg/g uma vez ao dia, 5 dias por semana por 6 semanas. Reações adversas cutâneas são freqüentes chegando a índices de 75%, o que acarreta em pausas durante o tratamento. As reações adversas mais comuns são eritema, erosão, descamação, edema, prurido, induração e ulceração. Mais de 60% dos pacientes desenvolvem eritema moderado a grave (Wagstaff e Perry, 2007). A possibilidade de tratamento não invasivo e não hospitalar com a eficácia já demonstrada do imiquimode é uma alternativa atraente a diversos pacientes.

O imiquimode foi selecionado na presente proposta como fármaco alvo para a nanoencapsulação devido ao fato de preencher os requisitos necessários para justificar o interesse do emprego da nanotecnologia. É um fármaco recente com aplicações

terapêuticas importantes, é lipossolúvel (fator chave para a obtenção de elevadas eficiências de encapsulação), apresenta efeitos adversos os quais podem, em hipótese, serem reduzidos através de sua inclusão em nanopartículas e há necessidade de sua permanência sobre a superfície cutânea por longos períodos, o que também pode ser modulado pela nanoencapsulação.

4. Parte Experimental

4.1 Materias

O Imiquimode (IMQ) foi obtido da Chemical Goods (China), a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (\overline{M}_w 1400 g.mol⁻¹) e o Span 60[®] (Monoestearato de sorbitano) da Aldrich (França). O polissorbato 80 e o monooleato de sorbitano da Delaware (Brasil). A manteiga de cupuaçu e o óleo de copaíba da Inovam (Brasil), os demais óleos vegetais da Distriol (Brasil). A acetona da Vetec (Brasil) e o etanol da PA F. Maia usados eram de padrão analítico e a acetonitrila da Fairfield (EUA) e metanol da Merck (Brasil) de padrão CLAE.

4.2 Método analítico para quantificação do imiquimode

Um método analítico para quantificação de imiquimode foi validado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na faixa do ultravioleta (CLAE-UV). A fase móvel (0,8 mL.min⁻¹) consistiu de acetonitrila/água/trietilamina (30:69,85:0,15 v/v). O imiquimode foi detectado a 242 nm com um tempo de retenção de 9 min. Curvas padrão linear para o fármaco em metanol foram obtidas entre 0,5-70,00 µg.mL⁻¹ apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,99. O limite de quantificação obtido foi 0,80 µg.mL⁻¹ e o limite de detecção obtido foi 0,26 µg.mL⁻¹.

O método analítico utilizado para a quantificação de amostras dos estudos de liberação e permeação foi o mesmo utilizado para quantificação do fármaco nas formulações desenvolvidas. O método apresentou especificidade (sem co-eluição dos produtos da pele ou da fita adesiva que podem interferir no pico do fármaco) e linearidade no meio receptor (tampão acetato pH 3,7) na faixa de 0,5 a 70 µg.mL⁻¹, confirmado pela análise de variância, com coeficiente de determinação maior do que 0,99. A concentração de saturação do imiquimode em tampão acetato pH 3,7 foi de 4,8 ± 0,3 mg/ml confirmando a condição *sink* durante o experimento de liberação. A extração de imiquimode a partir de amostras de pele foi realizada por aplicação na pele de uma quantidade conhecida de imiquimode diluído em acetonitrila e, após a secagem do solvente, a amostra biológica foi cortada e colocada em tubos de ensaio contendo acetonitrila:metanol, 1:1. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, e posteriormente foram levadas ao banho de ultra-som durante 15 minutos e então filtração (0,45µm, Millipore, EUA) antes da análise de CLAE-UV. Os valores encontrados foram de 86,71% ± 7,24 (n=6) de imiquimode, que foram considerados valores adequados.

4.3 Seleção do óleo vegetal para compor as nanopartículas

Os óleos vegetais de copaíba, uva, linhaça, cenoura, algodão, canola e castanha do Brasil foram pré-selecionados para o estudo, devido às diversas propriedades como antioxidante, emoliente, anti-inflamatória, entre outras.

4.3.1 Efeito dos óleos nos filmes poliméricos de poli (ϵ -caprolactona)

O percentual de inchamento do filme polimérico nos diferentes óleos vegetais foi determinado através do controle da massa do filme polimérico imerso no óleo em função do tempo. Os filmes foram obtidos a partir de uma solução de poli(ϵ -caprolactona) em clorofórmio em placa de Petri por 24 horas, ocorrendo a completa evaporação do solvente. O filme foi dividido em partes pesando em torno de 0,2 g. Após, o filme foi imerso no óleo vegetal (Guterres *et al.*, 2000), sendo seco com papel absorvente e pesado depois de 0, 7, 14, 21,30 e 60 dias.

4.3.2 Concentração de saturação do imiquimode em diferentes óleos vegetais

A concentração de saturação do fármaco em diferentes óleos foi determinada colocando 1 mL de cada óleo em um tubo de eppendorff e acrescentando fármaco até sua completa saturação. Após, as amostras foram agitadas por 2 minutos em vórtex e após 24 horas foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída para a extração do fármaco com metanol. A solução foi filtrada e analisada por CLAE-UV (sessão 4.2)

4.4 Preparação das nanopartículas

Dois tipos de nanopartículas, frequentemente descritas na literatura e com grande potencial para aplicação na terapêutica, foram desenvolvidas neste trabalho: Nanocápsulas de núcleo lipídico e nanocarreadores lipídicos nanoestruturados.

4.4.1 Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado conforme proposto por Fessi *et al.*, 1989 com algumas adaptações (Venturini *et al.*, 2011). Para uma suspensão de nanocápsulas, o polímero (0,250 g) e o monoestearato de sorbitano (0,096 g) foram dissolvidos em uma mistura de solventes acetona (60 mL) e etanol (7 mL) sob agitação magnética constante à

40°C. Após, foi acrescentado o óleo (835 µL) e, então, o fármaco (0,025 g). Separadamente, o polissorbato 80 (0,196 g) foi adicionado à água (132 mL). A solução orgânica, totalmente solubilizada, foi vertida sobre a fase aquosa, sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, através de um funil. As suspensões foram mantidas sob agitação por 10 min. A seguir, procedeu-se à evaporação da suspensão em evaporador rotatório, eliminando a acetona à pressão reduzida. O volume final foi ajustado a 25 mL.

4.4.2 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

As dispersões aquosas de CLN foram preparadas segundo adaptação de metodologia previamente descrita (Müller *et al.*, 2000). A manteiga de cupuaçu (13,4 g), o óleo de copaíba (6,6 g) e o monooleato de sorbitano (3 g) foram dissolvidos em banho de ultrassom na temperatura ambiente e após foi adicionado o fármaco (0,2 g). A mistura foi dispersa sob alta agitação (5 min) usando um Ultra-Turrax (T25, Ika) em uma solução aquosa contendo polissorbato 80 (3,08 g), mantida à mesma temperatura da fase lipídica. A pré-emulsão obtida foi homogeneizada a alta pressão (Panda 2K NS1001L, Niro Saovi) aplicando-se 3 ciclos de 300 bar. O volume final foi de 200 mL.

4.5 Caracterização físico-química das formulações

4.5.1 Diâmetro e distribuição de tamanho de partícula

As análises de diâmetro foram realizadas por duas técnicas: difratometria de laser e espalhamento de luz dinâmico.

Através da técnica de difratometria de laser (Mastersizer 2000, Malvern) foram obtidos os valores de D [4,3] e SPAN, que é definido como (equação 1):

$$Span = \frac{D_{(90)} - D_{(10)}}{D_{(50)}} \quad (1)$$

onde $D_{(10)}$, $D_{(50)}$ e $D_{(90)}$ representam os diâmetros cumulativos de 10 %, 50 % e 90 % das partículas, respectivamente. Essa técnica foi utilizada com o intuito de analisar uma ampla faixa de tamanhos possibilitando a verificação da presença de partículas micrométricas. As análises foram realizadas após adição das amostras em dispersor contendo água destilada e mantidas sob agitação até atingir uma obscuração de 0,2.

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®], Malvern) foram obtidos os valores de diâmetro médio, distribuição de tamanho e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas. Esta técnica foi realizada com o intuito de analisar de forma mais adequada a faixa nanométrica de distribuição de tamanho de partículas. Os valores foram obtidos após diluição adequada das amostras (250 vezes, v/v) em água ultrapura previamente filtrada através de membrana 0,45 µm.

4.5.2 Potencial zeta

O potencial zeta foi obtido através de mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] nano-ZS, ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada através de membrana 0,45 µm.

4.5.3 pH

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro (B474, Micronal) diretamente nas formulações.

4.5.4 Viscosidade

A determinação da viscosidade das formulações foi conduzida em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro, utilizando *spindles* ULA a 23±1°C.

4.5.5 Morfologia

As análises morfológicas das nanopartículas foram realizadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para essa análise, as formulações foram diluídas em água ultrapura (5 vezes) e depositados sobre grids de cobre, contendo filme de Formvar-Carbono (*Electron Microscopy Sciences*), e, em seguida, negativamente contrastadas com solução de acetato de uranila (2% p/v). Análises foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM; JEM 1200 ExII) operando a 80 kV (Centro de Microscopia da UFRGS).

4.5.6 Teor de fármaco e Eficiência de encapsulação

A concentração do imiquimode (Imq) nas formulações foi determinada por CLAE-UV, através do método previamente validado (sessão 4.2). Uma alíquota de 100 µL da

suspensão foi tratada com uma mistura de solventes (acetonitrila:metanol, 1:1) filtrada (Millipore 0,45 μm) e injetada no CLAE-UV.

A concentração de ativo associado às nanopartículas (eficiência de encapsulação) foi avaliada considerando-se a diferença entre a concentração total na formulação (teor de fármaco) e a concentração na forma livre presente na fase aquosa da dispersão. A determinação do ativo livre foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação das dispersões (membrana Microcon[®] - MC Millipore) quantificando-se o fármaco livre no ultrafiltrado por CLAE-UV.

4.5.7 Estabilidade física

As suspensões de nanopartículas foram analisadas por um Turbiscan *Lab*[®] (Formulation, Laboratório K213, IQ-UFRGS) para avaliação da sua estabilidade física, levando em conta fenômenos de instabilidade como cremagem, sedimentação e aglomeração. As formulações foram colocadas dentro de uma cubeta de vidro transparente (20 mL) analisadas a 25° C, durante 3 horas. Esta técnica possui um sistema de detecção composto por um feixe de luz no infravermelho próximo ($\lambda=880\text{nm}$) e dois detectores: um de transmissão (T) e outro de retro-espalhamento (RE). O detector de T recebe a luz que atravessa a amostra (a 180° do feixe incidente), enquanto o detector de RE recebe a luz espalhada e refletida pela amostra (a 45° do feixe de luz incidente). O sistema detector realiza uma varredura do fundo ao topo da cubeta, adquirindo dados de transmissão e retro-espalhamento.

4.5.8 Liberação *in vitro*

A determinação do perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi realizada através do método de diálise direta. Uma membrana de diálise foi tratada por 1 hora em água ultrapura para a retirada do excesso de glicerol. As suspensões de nanopartículas (10 mL) foram inseridas em sacos de diálise que foram fechados com presilhas específicas e colocados em contato com 150 mL de meio de liberação (tampão acetato pH 3,7), mantidos sob agitação e temperatura controlada (32°C). Alíquotas do meio (1 mL) foram coletadas em tempos pré-determinados (de 5 min até 6 horas), filtradas e analisadas por CLAE-UV conforme previamente descrito. Conforme previamente mencionado, a condição *sink* foi respeitada durante o experimento.

Os ajustes matemáticos aos modelos semi-empíricos de primeira ordem monoexponencial (Eq. (2)) e bi-exponencial (Eq. (3)) para os dados experimentais da

liberação do fármaco foram realizados utilizando o software Scientist[®] 2.0 software (MicroMath[®], USA). Os modelos foram avaliados considerando o melhor ajuste gráfico, a correlação entre os pontos experimentais e os perfis teóricos e o valor mais elevado de critério de seleção de modelo (MSC).

$$C = 100 - [C_0 e^{-kt}] \quad (2)$$

$$C = 100 - [Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}] \quad (3)$$

Onde C (adimensional) é o percentual de imiquimode liberado no tempo t (h), C₀ (adimensional) é o conteúdo total do fármaco em percentual, e k, α e β (h⁻¹) são as constantes cinética de velocidade observadas.

4.6 Estudo do perfil de penetração/permeação do imiquimode a partir das nanopartículas

4.6.1 Preparação e estocagem das membranas

Os estudos de permeação *in vitro* do imiquimode foram realizados utilizando pele de abdômen de porcos fêmeas como membrana. As amostras de pele foram obtidas de animais recém sacrificados. Após a coleta, as amostras de pele foram limpas, removendo-se o tecido adiposo e os pêlos, e posteriormente estocadas sob refrigeração (-4 °C) até a utilização nos ensaios, por um tempo máximo de 3 meses. As membranas foram padronizadas com espessura média entre 1,8 mm e 2,1 mm, medidas com auxílio de um medidor de espessura N^o7301[®] (Mitutoyo).

4.6.2 Montagem das células de difusão do tipo Franz, *in vitro*.

O experimento foi realizado em um equipamento de Célula de Franz automatizada (MicroettePlus Multi-Group[®], Hanson Research Corporation). Cada célula permite uma área de contato com a membrana de 1,76 cm² e capacidade para armazenar 7 mL de meio receptor, que foi composto de tampão acetato pH 3,7. O meio receptor foi mantido sob agitação magnética a 32 ± 0,5 °C.

As suspensões de nanopartículas contendo imiquimode (4,5 mL) foram aplicados sobre a membrana, seguindo o princípio de dose infinita, e permaneceram em contato por 24 horas. As coletas foram efetuadas nos tempos 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas.

4.6.3. Técnica do *tape stripping*

A técnica de *tape stripping* foi utilizada com o intuito de retirar o estrato córneo das membranas possibilitando a quantificação do fármaco retido nesta camada. Consecutivas camadas do estrato córneo foram retiradas, aderindo à fita adesiva na área exposta ao produto. Foram utilizados 19 pedaços de fita adesiva Scotch 3M, medindo 19 x 40 mm para extração do estrato córneo. A primeira fita retirada foi excluída, pois representa a quantidade de ativo ainda restante no compartimento doador. As 18 fitas analisadas foram separadas em grupos de 3 fitas, totalizando 6 grupos, e foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo o solvente (acetonitrila:metanol, 1:1) e submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultra-som durante 15 minutos (Siqueira *et al.*, 2011). As amostras foram, então, filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm e posteriormente submetidas a doseamento conforme item 4.2.

4.6.4 Técnica de retenção cutânea

Após a remoção do estrato córneo por *tape stripping*, a epiderme e derme foram separadas, colocando a pele em água ultrapura a 60 °C por 45 segundos. Após esse procedimento a epiderme foi removida com auxílio de um bisturi e a derme foi cortada em pequenos pedaços, que foram colocadas em diferentes tubos de ensaio contendo o solvente extrator (acetonitrila e metanol). As amostras foram, então, submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultra-som durante 15 minutos (Siqueira *et al.*, 2011). Após este procedimento, as amostras foram filtradas, através de membrana com porosidade 0,45 µm, e o filtrado foi submetido à doseamento, conforme o item 4.2

4.7 Análise estatística

A significância estatística dos resultados obtidos foi analisada por teste t de Student para comparações entre duas amostras ou ANOVA seguido de Tukey para comparações entre mais de duas amostras (SigmaStat versão 3.5). Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Seleção do óleo vegetal para compor as nanopartículas

O teste de inchamento do polímero foi realizado para verificar a capacidade dos óleos vegetais pré-selecionados em dissolver o polímero poli (ϵ -caprolactona) (PCL), selecionado para a obtenção de nanocápsulas poliméricas. Quando o polímero é dissolvido no óleo, que constitui o núcleo oleoso das nanopartículas, espera-se a presença de instabilidades na formulação (Guterres *et al.*, 2000). Esse estudo foi realizado somente para o desenvolvimento das nanocápsulas de núcleo lipídico, visto que os carreadores lipídicos nanoestruturados não apresentam polímero em sua formulação.

Nos primeiros dias de estudo as massas dos filmes poliméricos de poli (ϵ -caprolactona) sofreram um incremento [8%(copaíba), 1,14% (uva), 6,3% (linhaça), 1,27% (cenoura), 2,00% (algodão), 5,86% (canola) e 5,07% (castanha) (Fig. 2), provavelmente devido a quantidade residual de óleo aderido ao filme polimérico que não pode ser completamente retirado com o papel absorvente. A partir da segunda pesagem as massas dos filmes poliméricos permaneceram constantes, indicando que os óleos não dissolveram o polímero. Portanto, esses óleos foram considerados opções viáveis para preparar nanocápsulas de núcleo lipídico.

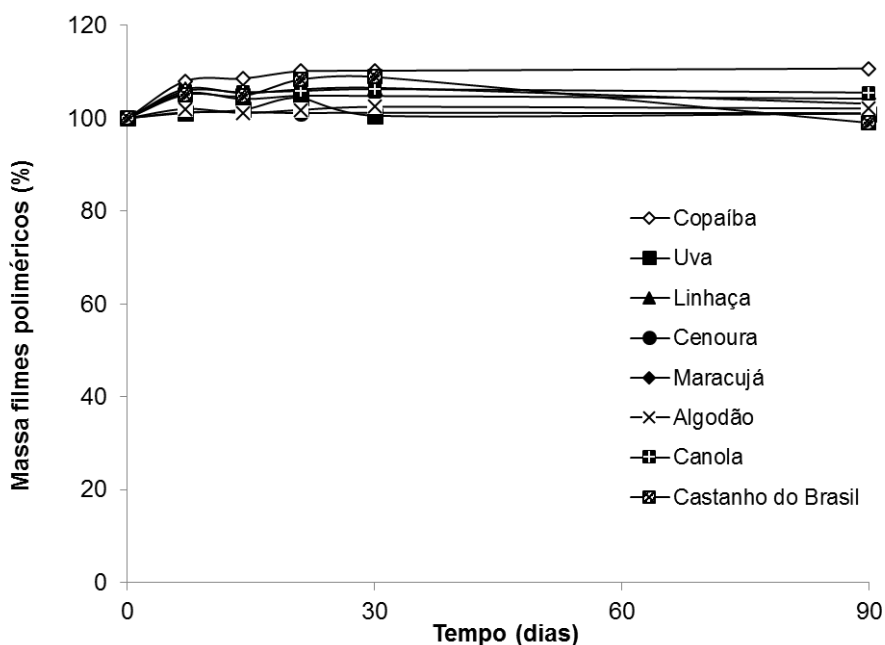


Figura 2. Perfil de inchamento do polímero (PCL) em diferentes óleos vegetais em função do tempo.

Para determinar qual dos óleos pré-selecionados seria mais adequado para o desenvolvimento das formulações foi determinada a concentração de saturação do fármaco nos diferentes óleos vegetais (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de saturação do imiquimode em diferentes óleos vegetais.

Óleo vegetal	Concentração de saturação do fármaco (mg/mL)
Canola	0.100
Castanha do Brasil	0.068
Copaíba	5,3
Maracujá	0.232
Uva	0.118
Algodão	0.029
Cenoura	0.053
Linhaça	0.051

O óleo que apresentou a maior concentração da saturação foi o de copaíba (5,3 mg/ml). Uma vez que o óleo em questão, além de apresentar uma maior capacidade de solubilizar o imiquimode, também não afetou o filme polimérico de PCL, este foi o óleo selecionado para o desenvolvimento das nanocápsulas de núcleo lipídico e dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Além disso, cabe ressaltar, que o óleo de copaíba apresenta atividade antitumoral (Lima *et al.*, 2003) o que deve auxiliar no efeito do fármaco durante o tratamento.

5.2 Caracterização das nanopartículas

Após a seleção do óleo vegetal, suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparadas contendo o óleo de copaíba e 1 mg/mL de imiquimode. A concentração de imiquimode ideal para obtenção de formulações nanotecnológicas, foi determinada por pré-testes (dados não mostrados). As formulações apresentaram aspecto leitoso e homogêneo, com coloração branca e odor característico de óleo de copaíba.

5.2.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho de partículas obtida por difratometria de laser se encontra na Figura 3. Pode-se observar que todas formulações apresentaram apenas populações nanométricas e distribuição monomodal. Na tabela 1, são apresentados os valores de D_{4,3} e SPAN (obtidos por difratometria de laser) e diâmetro médio e polidispersão (obtidos por espalhamento de luz dinâmico). As nanopartículas apresentaram tamanho nanométrico, considerando ambas as técnicas, e adequados valores de SPAN (próximos a 1) e PDI (inferiores a 0,20), indicando a homogeneidade na distribuição de tamanho de partícula das formulações. As nanopartículas lipídicas apresentaram menor diâmetro em relação às poliméricas ($p < 0,05$).

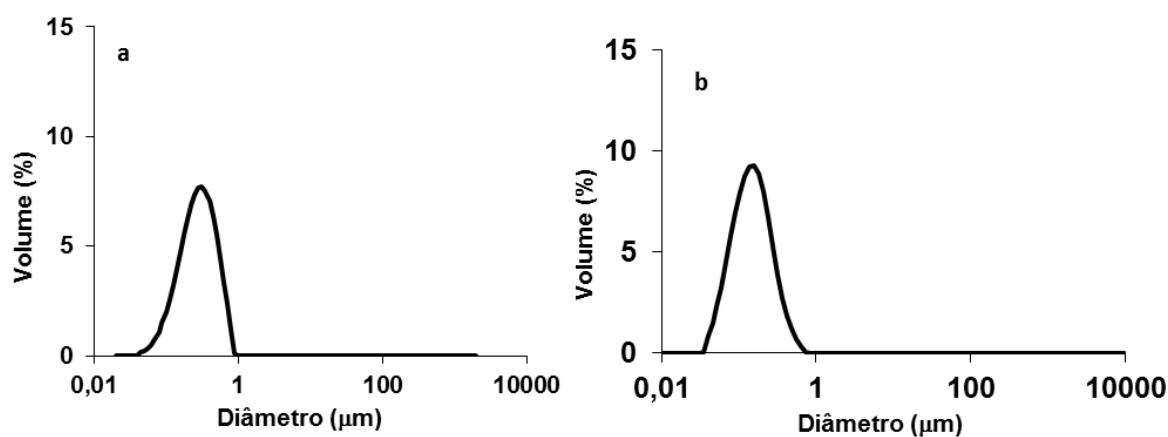


Figura 3: Representação gráfica da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas e carreadores lipídicos nanoestruturados: a) NCL b) CLN.

Tabela 2. Distribuição granulométrica das formulações obtidos por difração de laser e espalhamento de luz dinâmico.

NC	$D[4,3]$ (nm)	SPAN	Diâmetro médio (nm)	PDI
NCL	279 ± 2	1.563 ± 0.11	206 ± 6	$0,159 \pm 0,02$
CLN	153 ± 4	1.521 ± 0.21	177 ± 2	$0,084 \pm 0,01$

5.2.2 Potencial Zeta

Os valores de potencial zeta obtidos foram de $-12,1 \pm 1,7$ mV para NCL e $-12,7 \pm 3,6$ mV para CLN. Os valores de potencial zeta estão perto de zero, devido ao efeito estérico causado pelo polissorbato 80.

5.2.3 pH

Os valores de pH encontrados foram de $6,24 \pm 0,08$ para NCL e $6,0 \pm 0,02$ para CLN. Esses valores encontrados são condizentes com as matérias-primas utilizadas para preparação. A literatura relata que as suspensões de nanocápsulas preparadas por precipitação e com poliésteres apresentam valores de pH em torno de 6,0 (Schaffazick *et al.*, 2003). Os valores de pH levemente ácidos apresentados pelas formulações é semelhante ao pH do estrato córneo, portanto são formulações adequadas para aplicação cutânea (Barata, 2002).

5.2.4 Viscosidade

Os valores de viscosidade encontrados para as duas suspensões de nanopartículas foram muito semelhantes ($0,001265 \pm 0,007$ Pa.s para NCL e $0,001475 \pm 0,021$ Pa.s para CLN, considerando uma taxa cisalhamento de $6,11 \text{ s}^{-1}$ ou 50 RPM), o que é considerado adequado uma vez que a viscosidade do veículo pode influenciar na penetração cutânea de substâncias. As formulações apresentaram baixa viscosidade, semelhante à da água, devido ao pequeno tamanho de partículas e homogeneidade dos nanosistemas.

5.2.5 Morfologia

Nas fotomicrografias (Fig. 4) obtidas a partir das nanocápsula de núcleo lipídico e de carreador lipídico nanoestruturado contendo imiquimode, observa-se a presença de estruturas esféricas, relativamente similares entre si indicando baixa polidispersão do sistema. Os diâmetros obtidos através das demais técnicas utilizadas foram similares ao encontrado pela microscopia eletrônica de transmissão.

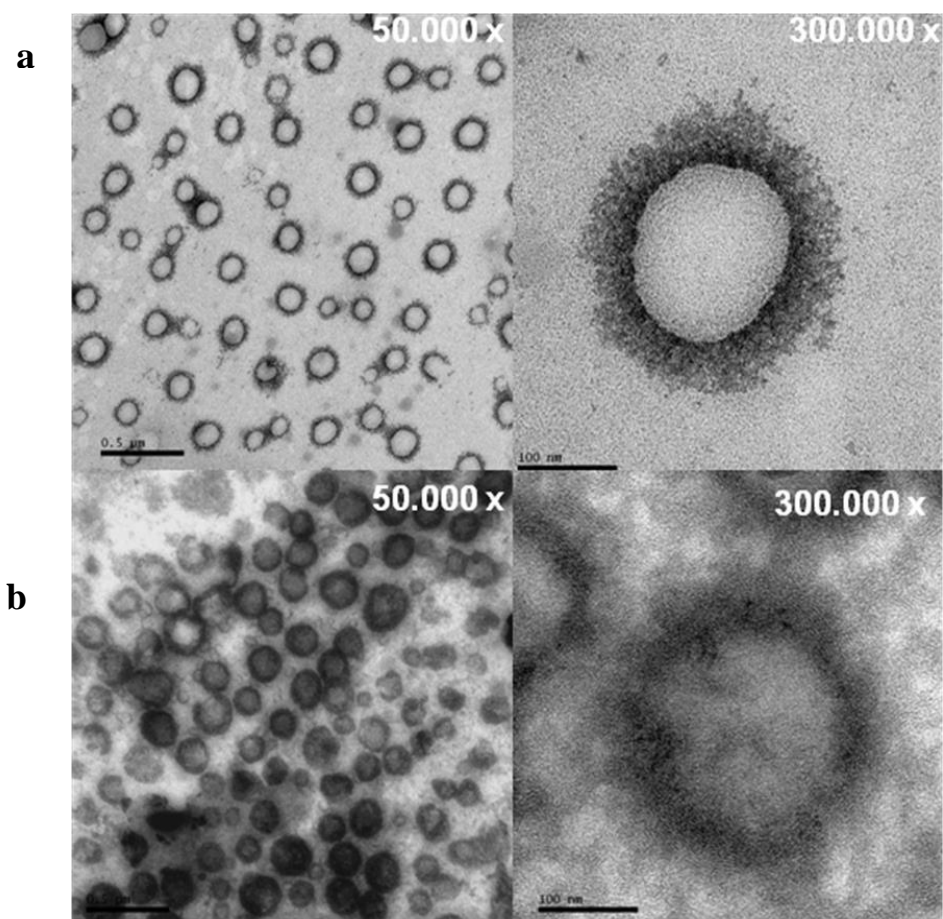


Figura 4: Fotomicrografias das formulações a) NCL e b) CLN.

5.2.6 Teor de Fármaco e Eficiência de encapsulação

Os teores experimentais obtidos foram próximos as concentrações teóricas para as duas formulações. Para NCL, o teor de fármaco obtido foi de $970 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ (correspondente a 97%) e para CLN foi de $980 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (correspondente a 98%).

A eficiência de encapsulação para NCL obtido por ultrafiltração-centrifugação foi 97,9%, indicando elevada capacidade de encapsulação do imiquimode no sistema, provavelmente devido a boa solubilidade do imiquimode no óleo de copaíba (5,3 mg/ml). Já para CLN a eficiência de encapsulação foi maior que para NCL (99,98%), esse percentual mais elevado pode ser devido a presença da manteiga de cupuaçu nesse sistema. (Chollet et al, 1999)

5.2.7 Estabilidade física

Através da análise de retroespalhamento de luz é possível identificar fenômenos de alteração de diâmetro como floculação e coalescência e fenômenos de migração de gotículas/partículas como cremagem e sedimentação. A principal vantagem desta técnica é a detecção dos fenômenos de instabilidade de forma mais fácil e segura do que por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados. (Lemarchand *et al.*, 2003). No caso de sistemas opacos as desestabilizações serão obtidas através de alterações no retroespalhamento de luz, e para sistemas translúcidos isso será visualizado através de alterações nas medidas de transmissão da luz.

Análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas para a NCL e CLN logo após o preparo das formulações, por um período de 3 horas (Fig. 5).

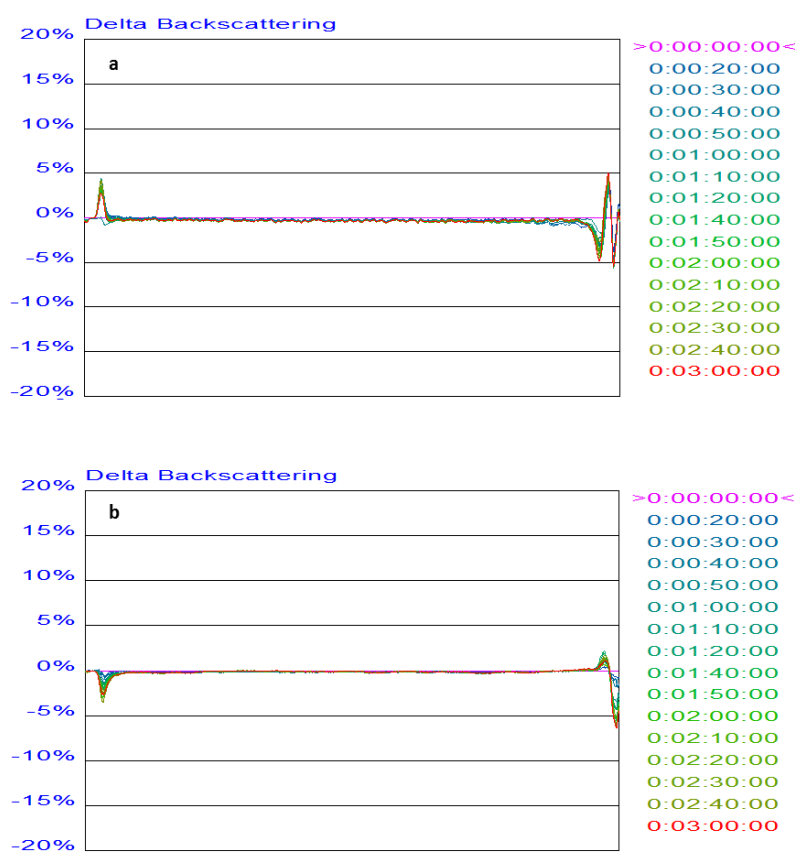


Figura 5. Perfil de retro-espalhamento da formulação a) NCL b) CLN.

As análises de transmissão para as formulações foram nulas, propiciando-se a análise de retro-espalhamento de luz. Para a NCL à temperatura ambiente, ocorreu um aumento da variação de retro-espalhamento na região inferior da cubeta (5%) e uma

diminuição na região superior, demonstrando uma leve tendência à sedimentação. Para a CLN pode-se observar um aumento da variação de retro-espalhamento na região superior da cubeta (2%) e uma diminuição na região inferior da cubeta. Esse perfil de retro-espalhamento indica uma tendência à cremagem. Fenômenos detectados através da variação do diâmetro das partículas, como floculação ou coalescência, geralmente irreversíveis, não foram observados para ambos nanocarreadores. As suspensões de nanopartículas foram consideradas fisicamente estáveis.

5.2.8 Perfil de liberação *in vitro*

O meio de liberação escolhido foi o tampão acetato pH 3,7 devido a boa solubilidade do fármaco neste meio. O perfil de liberação do imiquimode a partir dos sistemas nanoestruturados e do fármaco livre é apresentado na Figura 6.

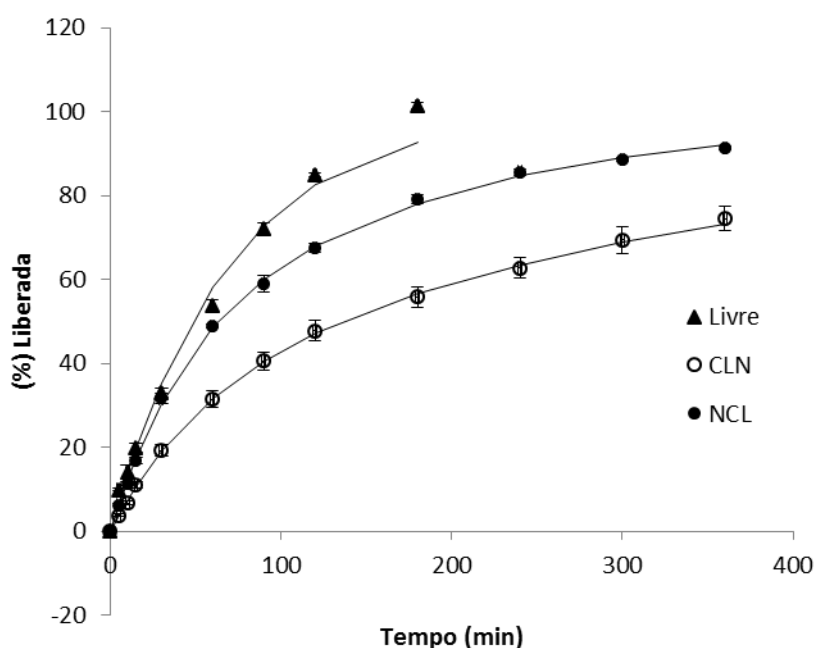


Figura 6. Perfil de liberação do imiquimode a partir dos nanosistemas (linha contínua representa a modelagem monoexponencial para o controle e biexponencial para CLN e NCL).

Os perfis de liberação *in vitro* foram obtidos considerando a porcentagem de fármaco liberado em função do tempo (Fig. 6). Visto que o imiquimode apresentam baixa solubilidade em água uma solução metanólica foi utilizado como controle. Diferença

significativa ($p < 0,05$) foram observadas entre todas as amostras para todos os tempos de análise, a exceção do tempo 30 minutos, onde NCL não se diferenciou significativamente do controle. No tempo 180 minutos a liberação do fármaco livre alcançou $101,4 \pm 0,8\%$, enquanto que para o mesmo tempo $79,0 \pm 1,1\%$, e $55,83 \pm 2,37\%$ foram observados para NCL e CLN, respectivamente. Observa-se que ambas nanopartículas são capazes de controlar a liberação do fármaco, porém a nanopartícula lipídica apresenta um controle maior da liberação do imiquimode. Os resultados sugerem uma grande afinidade do fármaco pela manteiga de cupuaçu, uma vez que a presença deste material difere as duas nanopartículas. A manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um lipídeo sólido a temperatura ambiente, composto por ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente ácidos linoléico e palmítico, e zinco (Rogez *et al.*, 2004). Em trabalho previamente descrito (Chollet *et al.*, 1999) foram analisadas as solubilidades do imiquimode no ácido linoléico e oléico, e valores de 17 mg/mL e 20 mg/mL foram encontrados, respectivamente. Esses valores são maiores que os observados para o óleo de copaíba (5,3 mg/mL).

A modelagem matemática semi-empírica dos perfis foi realizada aplicando-se os modelos de primeira ordem monoexponencial e biexponencial. Considerando os valores de MSC e coeficiente de correlação, o melhor modelo para descrever os perfis de liberação do imiquimode a partir das nanoestruturas foi a equação biexponencial. Já para o controle o melhor modelo foi o monoexponencial. As constantes de velocidade aparentes (k , α , β), os coeficientes de correlação (r) e os valores de MSC são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Constantes de velocidade aparentes (k , α , β), coeficientes de correlação (r) e os valores de MSC obtidos pela modelagem dos perfis de liberação do IMQ (Não foi possível aplicar o modelo biexponencial ao controle de fármaco livre).

Parâmetros	Livre	NCL	CLN
Monoexponencial			
k (h^{-1})	$0,0147 \pm 0,0004$	$0,0095 \pm 0,0004$	$0,0045 \pm 0,0004$
r	$0,9954 \pm 0,0003$	$0,9972 \pm 0,0004$	$0,9917 \pm 0,0012$
MSC	$4,2080 \pm 0,0507$	$4,0916 \pm 0,0982$	$3,2623 \pm 0,1797$
Biexponencial			
α (h^{-1})	-	$0,0232 \pm 0,0042$	$0,0187 \pm 0,0019$
β (h^{-1})	-	$0,0054 \pm 0,0003$	$0,0025 \pm 0,0002$
r	-	$0,9999 \pm 5,524(10^{-5})$	$0,9998 \pm 0,0001$
MSC	-	$7,1155 \pm 0,3962$	$6,8503 \pm 0,5289$
A	-	$46,7479 \pm 6,8155$	$34,0368 \pm 3,0325$
B	-	$53,9224 \pm 6,8571$	$66,0513 \pm 2,9150$

No modelo biexponencial, a liberação é considerada bifásica, com uma fase de liberação rápida (*burst*) e a segunda fase corresponde à liberação sustentada (velocidade de liberação mais lenta). A fase de liberação rápida apresentou $\alpha = 0,0232 h^{-1}$ para NCL e $\alpha = 0,0187 h^{-1}$ para CLN. Já a fase de liberação lenta apresentou $\beta = 0,0054 h^{-1}$ para NCL e $\beta = 0,0025 h^{-1}$ para CLN. O parâmetro A, que consequentemente corresponde ao percentual de fármaco retido e/ou adsorvido na superfície das partículas, foi de 47% para NCL e 34 % para CLN. Indicando que 53%, do IMQ está internalizado na NCL e 66% do IMQ está internalizado no CLN. A maior afinidade pela manteiga de cupuaçu, presente na CLN, em comparação ao óleo de copaíba explica este resultado.

5.3 Estudo do perfil de penetração/permeação do imiquimode a partir das nanopartículas

Após finalizada a caracterização físico-química das formulações, que demonstraram propriedades como tamanho nanométrico e homogêneo, estabilidade e controle de liberação, foi avaliada a influência do tipo de nanoestrutura em relação a alteração do tempo de permanência e penetração do imiquimode na pele, visando a escolha da formulação mais promissora para o tratamento de carcinoma cutâneo. Empregaram-se células de difusão de Franz automatizadas e membrana pele de abdômem suíno. A análise da penetração cutânea foi realizada comparando-se a quantidade de imiquimode detectada em μg por cm^2 de pele nas diferentes camadas (estrato córneo, epiderme viável, derme) (fig.7).

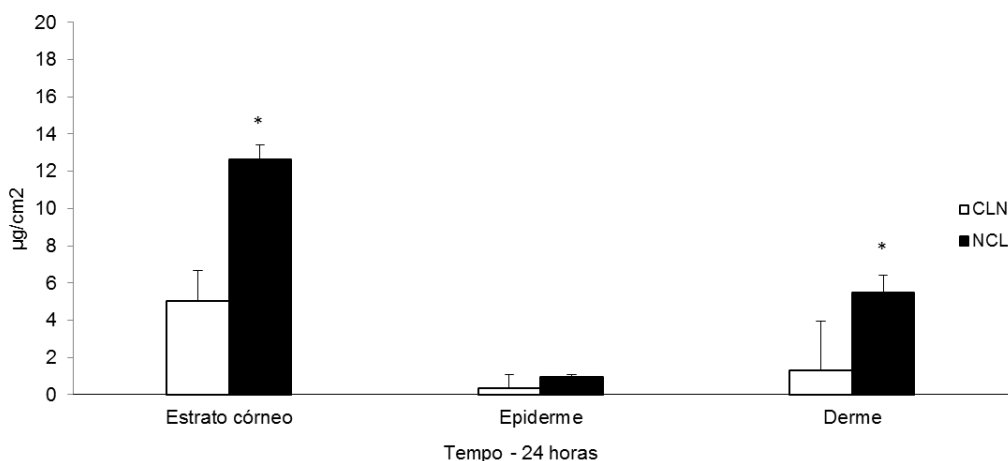


Figura 7. Concentrações de imiquimode após 24 horas, nos diferentes compartimentos da pele.

Pode-se observar que o tipo de nanoestrutura influencia na localização do fármaco nos diferentes compartimentos da pele. A nanocápsula de núcleo lipídico levou a presença de uma maior quantidade de imiquimode no estrato córneo, epiderme e derme, com diferença significativa para o estrato córneo e derme ($p < 0,05$). A quantidade de imiquimode presente na derme foi, aproximadamente, quatro vezes maior para NCL em relação ao carreador lipídico nanoestruturado ($5,47 \pm 2,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para NCL e $1,31 \pm 0,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para CLN). O carcinoma basocelular surge de células pluripotentes na camada basal da epiderme (Roewert *et al.*, 2007), e cresce e penetra a derme (Ishi, *et al.*, 2004), portanto o fato do imiquimode atingir a derme é muito importante para o tratamento desse tumor. A NCL levou a maior retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele e no estrato

córneo possivelmente, devido sua matriz rígida, que age como um sistema reservatório, que é capaz de liberar o fármaco gradativamente.

O carreador lipídico nanoestruturado (CLN), por outro lado, permitiu que o fármaco permeasse em maior quantidade até a o receptor (fig. 8), observando diferença significativa para todos os tempos de análise ($p < 0,05$). Estudos já demonstram que após a aplicação tópica, as nanopartículas lipídicas perdem sua forma após 2h de contato, devido à interação entre os componentes de partículas e lipídios da pele, esse fato pode reduzir a função barreira da pele e favorecer o processo de penetração (Contri *et al.*, 2011). Também, o menor tamanho de partícula observado para as nanopartículas lipídicas pode ter influenciado na maior penetração para o receptor. É importante ressaltar que no estudo de liberação *in vitro*, a CLN foi capaz de controlar mais a liberação do fármaco, no entanto nesse tipo de estudo não é levado em consideração a real interação com uma membrana biológica (pele), e nesse caso não houve a interação da partícula com os lipídios da pele, portanto não houve o favorecimento da penetração. Esse resultado demonstra a importância de realizar estudos de permeação cutânea.

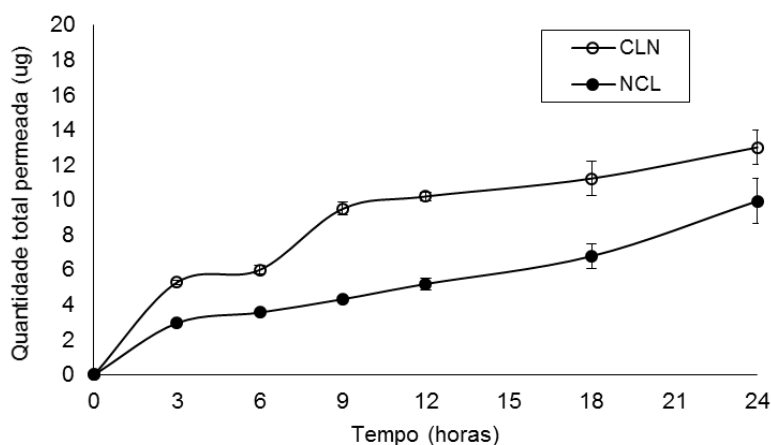


Figura 8. Concentrações de imiquimode após 24 horas, no meio receptor.

Reações sistêmicas já foram descritas para o imiquimode (Wagstaff e Perry, 2007), o que indica a importância da retenção do fármaco na pele. A quantidade encontrada no receptor para a CLN foi superior a quantidade que ficou retida na pele, confirmando que a CLN favoreceu permeação do imiquimode, provavelmente devido a interação com os lipídeos do estrato córneo. Para a NCL a quantidade total retida na pele foi 3,5 vezes maior

que a encontrada no receptor. Portanto, a nanopartícula que apresentou o melhor perfil de penetração/permeação cutânea foi a nanocápsula de núcleo lipídico.

6. Conclusão

Com os resultados obtidos, foi possível desenvolver e caracterizar formulações nanotecnológicas contendo óleo de copaíba, um óleo com atividade antitumoral, e contendo imiquimode, um fármaco já conhecido pela sua atividade contra carcinoma basocelular. A nanocápsula de núcleo lipídico apresentou-se como um ótimo sistema nanotecnológico por incorporar o fármaco com facilidade, liberá-lo de forma controlada e permitir uma permanência maior do fármaco na pele, mostrando ser um sistema promissor na terapia do carcinoma cutâneo.

7. Referências Bibliográficas

Azevedo,R.; Onofra,C.; Wadt, P.; Wadt, L.H. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.583-91, 2006.

Barata, E. A. F. *A Cosmetologia: Princípios básicos*. São Paulo: **Tecnopress**, 2002. p. 19.

Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**,v.56, n.11, p.1649-1659, 2004.

Caminade, A-M.; Turrin, C-O.; Majoral, J-P. Biological properties of phosphorus dendrimers. **New Journal of Chemistry**, v.34, n.8, p.1512-1524, 2010.

Cevc, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, n.5, p.671-675, 2004

Chollet,J.L.; Jozwiakowski, J.; Phares,K.; Reiter,M.; Roddy,P.; Schultz, H.,.Ta, Q.; Tomai, M. Development of a Topically Active Imiquimod Formulation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.4, n.1, p.35-43, 1999.

Cruz, L.; Schaffazick, S. R.; Dalla Costa, T.; Soares, L. U.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Schapoval, E. E. S.; Pohlmann, A. R.; Physico-Chemical Characterization and *In Vivo* Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, n.9-10, p.3154-3162,2006.

Contri,R; Fiel,L;Pohlmann, A, Guterres,S; Beck, R. Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and in Vitro Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration. In:Beck,R;Guterres,S and Pohlmann,A. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. 1 ed. Heidelberg:Springer, 2011. p 14-15.

Contri, R. V.; Ribeiro, Kênia L.F. ; Fiel, Luana A. ; Pohlmann, Adriana R. ; POHLMANN, A. R. ; Guterres, Silvia S. . Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v.8, n.7-8, p. 913-924, 2013.

Esmaeili, F.; Ghahremani, M. H.; Ostad, S. N.; Atyabi, F.; Seyedabadi, M.; Malekshahi, M. R.; Amini, M.; Dinarvand. R. J. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. **Drug Target**, v.16, n.5, p. 415, 2008.

Feng, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v.1, n.1, p. 115–125, 2004.

Fessi H, Puiseix F, Devissaguet J-P, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1-4, p.R1-R4, 1989.

Festa-Neto C. Tumores cutâneos malignos. In: Cucé LC, Festa Neto C. Manual de Dermatologia. São Paulo: Atheneu, 2001.p. 441-457

Festa Neto, Cyro. Tratamento tópico do carcinoma basocelular superficial e nodular pelo imiquimod creme a 5%: observação de 10 casos. **Anais brasileiros de Dermatologia**, n.77, v.6. p.693-698, 2002.

Godoy, H. T.; Rodrigues-Almays, D. B. Occurrence of cis-Isomers of Provitamin A in Brazilian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.42, v.6, p.1306-1313, 1994.

Guterres,S.S.;V. Weiss, L.D.L. Freitas, and A.R. Pohlmann, Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v.7, n.4, p.195–199, 2000.

Guterres, S. S.; Alves, M. P.; Pohlmann, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

Hadgraft, J.: Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, n.1-2, p.1–18, 2001.

Jager, A., Stefani, V., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R.,. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.338, n.1-2, p.297-305, 2007.

Jenning, V.; Schafer-Korting, M.; Gohla, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v.66, n.2-3, p.115-126, 2000.

Ishi LA, Pereira IC, Schellini AS, Marques MEA, Padovani CR. Carcinoma basocelular de palpebras – fatores relacionados com a recidiva tumoral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n.4, p.423-430, 2004

Legrand, P.; Barrat, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems, A review. **STP pharma sciences** . v. 9, n.5, p.411-418, 1999.

Lemarchand C, Couvreur P, Besnard M, Costantini D, Gref R. Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. **Pharmaceutical Reserach**, v.20, n.8, p.1284-1292, 2003.

Li, S. D.; Huang, L. Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. **Journal of Controlled Release**, v.145, n.3, p. 178-181, 2010.

Licciardi, M.; Cavallaro, G.; Di Stefano, M.; Pitarresi, G.; Fiorica, C.; Giammona, G. New self-assembling polyaspartylhydrazide copolymer micelles for anticancer drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.396, n.1-2 , p.219-228, 2010.

Lima SR.; Junior VF.; Christo HB.; Pinto AC.; Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of Copaifera multijuga Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v.17, n.9, p.1048-1053, 2003.

Mainardes, R. M.; Khalil, N. M.; Gremiao, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n.1-2, p. 266-271, 2010.

Mehnert, W.; Mäder, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 47, v.2-3, p. 165-196, 2001.

Minaglou, F.H e O. Bolcato. The potential role of specific essential oils in the replacement of dermacorticoid drugs (strong, medium and weak) in the treatment of acute dry or weeping dermatites. **International Journal of Aromatherapy**, v.15, n.2, p.66-73, 2005

Mora-Huertas CE, H. Fessi, A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, n.1-2, p.113–142, 2010.

Morganti, P.; Ruocco, E.; Wolf, R.; Ruocco, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v.19, n.4 p.489-501, 2001.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, 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, n.5, p.614-626, 2000.

Mu, L.; Seon, P-H.; Ang, S-H.; Feng, S-S. Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n.1, p. 58-65, 2004.

Mühlen, A.Z; Schwarz, C.; Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 45, v.2, p.149-155, 1998.

Müller, C. R.; Schaffazick, S. R; Pohlmann, A. R.; Luccas Freitas, L.; Pesce Da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, n.11 , p. 864-867, 2001.

Müller, R. H. Solid lipid nanoparticle (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 50, v.1, p.161-177, 2000.

Müller, R. H.; Petersen, R. D.; Hommos, A.; Pardeike, J. Nanostructured lipid carriers (NCL) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.6, p.522-530, 2007.

Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v.125, n.3, p.193-209, 2008.

Neville JA, Welch E, Leffell Ja. Management of Nonmelanoma Skin Cancer in 2007. **Nature Clinical Practice Oncology**, v.4, n.8, p. 432-469, 2007.

Ohsaki, A.; Yan LT.; Ito, S.; Edatsugi, H.; Iwata, D.; Komoda, Y. The isolation and in vivo potent antitumour activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii*. **Desfon. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.4, n.24, p.2889-2892, 1994.

Pohlmann, A. R.; Cruz, L.; Mezzalira, G.; Soares, L. U.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v.4, n.5, p.454-467, 2007.

Prado, R; Francis, O.S; Mason, M.N; Wing, G; Gamble, G,R; Dellavalle, R.. Nonmelanoma Skin Cancer Chemoprevention. **Dermatologic Surgery**, v.37, p.1566–1578, 2011.

Ribeiro, C. Cosmetologia aplicada a dermocosméticos. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

Rede integrada de indicadores para a saúde. Indicadores de Mortalidade: C4- Mortalidade proporcional por grupo de causas.

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c04.def>>. Acesso em 30 mar. 2014.

Roewert, H.J.; Lange, A.B, Stockfleth E.; Kerl H. Epidemiology and etiology of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, n.157, n.2, p.47-51, 2007.

Rogez, H.; Buxant, R.; Mignolet, E.; Souza, J.N.S.; Silva, E.M.; Larondelle, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Journal of Research and Technology**, v.218, n.4, p.380-384, 2004.

Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.13, p. 5062-5072, 2007.

Sauder, D. N. Imiquimod: modes of action. **British Journal of Dermatology**, v.149, n.66, p.5–8, 2003.

Semete, B.; Booyesen, L.; Lemmer, Y.; Kalombo, L.; Katata, L.; Verschoor, J.; Swai, H. S. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. **Nanomedicine**, v.6, n.5, p.662-671, 2010.

Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; De Cordova, C. A. S.; Creczynski-Pasa, T. B.; Guterres, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.289, n.1, p. 209-213, 2005.

Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; Guterres,. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.3, p. 209-213, 2006.

Shenoy, D. B.; Amiji, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal Pharmaceutics**, v.293, v.1-2, p.261–270, 2005.

Siqueira, N. M., Contri, R. V., Paese, K., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R. Guterres, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated

Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.24, n.3, p.166-174, 2011.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Of Controlled Release**, v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

Souto, E. B.; Wissing, S. A.; Barbosa, C. M.; Müller, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n.58, v.1, p.83-90, 2004.

Sridaeng, D.; Weingart, J. J.; Chantarasiri, N.; Zhe, J.; Hu, J. J. Postsynthetic Surface Functionalization, Encapsulation, and Releasing Studies of a Novel Polymer Nanocapsule. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, n.2, p.706-713, 2010.

Stecová , J.; Mehnert, W.; Blaschke, T.; Kleuser, B.; Sivaramakrishan, R.; Zouboulis, C.; Seltmann, H.; Korting, H. C.; Kramer, K. D.; Schäfer-Korting. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticle for topical acne treatment: Particle characterisation and skin uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p.991-1000, 2007.

Veiga Junior, V.F.; Pinto, AC. The *Copaifera* L. genus. **Quimica Nova**, v.25, n.2, p. 273-286, 2002.

Veiga Junior, V.F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.M.O.; Pinto, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.2, p.248-254, 2007.

Venturini, G. C.; Jager, E.; Oliveira, P. C.; Bernardi, A.; Battasttini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces**, v.375, n. 1-3, p.200-208, 2011.

Verma, D. D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.258, p.141-151, 2003.

Wagstaff, A. J.; Perry, C. M. Topical imiquimode- A review of its use in the management of anogenital warts, actinic keratoses, basal cell carcinoma and other skin lesions. **Drugs**, v.67, n.15, p.2187-2210, 2007.

Zhang, Y.; Zhu, S. Y.; Yin, L. C.; Qian, F.; Tang, C.; Yin, C. H. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 44, n.6, p. 1654-1661, 2008.