

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

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
CUTÂNEAS DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA CONTENDO NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS**

RENATA VIDOR CONTRI

PORTO ALEGRE, 2013

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

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
CUTÂNEAS DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA CONTENDO NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS**

Tese apresentada por
Renata Vidor Contri para obtenção
do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres**
PORTO ALEGRE, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.10.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr^a. Andressa Bernardi
Fundação Oswaldo Cruz

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

Prof^a. Dr^a. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Maria Ismenia Zulian Lionzo
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Contri, Renata Vidor
Determinação da estrutura e avaliação das
propriedades cutâneas de hidrogéis de quitosana
contendo nanocápsulas poliméricas / Renata Vidor
Contri. -- 2013.
351 f.

Orientadora: Silvia Stanisquaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2013.

1. Nanocápsulas. 2. Quitosana. 3. Permeação
cutânea. 4. Irritação cutânea. 5. Nanotoxicidade. I.
Guterres, Silvia Stanisquaski, 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 realizado no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e no Laboratório K204 do Instituto de Química, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, com financiamento do CNPq, à exceção do capítulo VI que foi realizado durante período sanduíche no Instituto de Farmacologia e Toxicologia da *Freie Universität Berlin*, Alemanha, com financiamento da CAPES (PDSE).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e por guiar os meus caminhos.

Agradeço ao meu noivo Moacir Kaiser por toda a ajuda e, mais importante que isso, por me amar e me mostrar o quanto sou capaz.

Agradeço aos meus pais por todo amor, pelo apoio e por sempre acreditarem no valor dos estudos.

Agradeço à minha irmã por estar sempre perto, me aconselhando e me ajudando, inclusive diretamente em alguns capítulos desta tese.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade.

Agradeço aos órgãos financiadores deste trabalho, CNPq e CAPES.

Agradeço à professora Silvia Stanisçuaski Guterres pela orientação e também pelas oportunidades, confiança e carinho.

Agradeço à professora Adriana Raffin Pohlmann e ao Professor Ruy Carlos Ruver Beck pelas importantes contribuições neste trabalho.

Agradeço à professora Irene Clemes Kulkamp Guerreiro pelos ensinamentos, pela ajuda e pelas oportunidades.

Agradeço aos professores Helder Ferreira Teixeira, Letícia Scherer Koester, Nadya Pesce da Silveira, Maria Ismenia Zulian Lionzo e Andressa Bernardi pela participação na banca de qualificação e/ou defesa de tese deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do laboratório 405 (Faculdade de Farmácia) e K204 (Instituto de Química) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelas discussões científicas, pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração e alegria que tornaram o dia a dia mais leve e prazeroso.

Em especial, agradeço aos colegas que colaboraram diretamente no meu trabalho pela ajuda e empenho.

Agradeço a minha amiga Luana Almeida Fiel, que iniciou e permaneceu durante esta caminhada ao meu lado, pela grande amizade e apoio.

Agradeço à *Freie Universität Berlin*, à professora Monika Schäfer-Korting e aos colegas desta instituição por me receberem para o doutorado sanduíche.

E agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a construção e realização deste trabalho.

“Eu sei o preço do sucesso: dedicação, trabalho duro, e uma incessante devoção às coisas que você quer ver acontecer.” (Frank Loyd Wright)

RESUMO

Introdução e Objetivos: Hidrogéis de quitosana apresentam uma grande aplicabilidade na área farmacêutica. A combinação destes com sistemas nanométricos carreadores de fármacos pode representar a unificação de vantagens, como a bioadesividade, formação de filme e potencial de regeneração cutânea por parte da quitosana e a possibilidade de uma liberação controlada e mais efetiva do fármaco, além de proteção deste frente à degradação, por parte das nanocápsulas. O presente trabalho tem por objetivo a determinação da estrutura e das propriedades cutâneas (bioadesividade, sensorial, penetração, citotoxicidade e irritação) de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, além de determinar a influência das nanopartículas na irritabilidade e na permeação cutânea de capsaicinóides. Adicionalmente, a presente tese tem como objetivo desenvolver um hidrogel regenerador da pele, a partir da quitosana e do óleo de rosa mosqueta.

Metodologias: Para a obtenção das nanocápsulas [brancas, fluorescentes ou contendo ativos (capsaicina ou óleo de rosa mosqueta)] foi utilizada a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando polímeros acrílicos (Eudragit®). As nanocápsulas e os hidrogéis de quitosana (ou de hidroxietilcelulose, usado como controle) foram avaliados utilizando diferentes técnicas. Foram realizados estudos *in vitro* de bioadesividade e de permeação/penetração cutânea utilizando pele de porco e pele humana em células de Franz padrão e/ou modificadas e estudo *in vitro* de lipoperoxidação para avaliar a oxidação do núcleo oleoso de origem vegetal. Estudos de toxicidade *in vitro* foram realizados com células primárias de pele humana (queratinócitos e fibroblastos) e membrana corioalantóide obtida de ovos embrionados. Estudos em humanos foram realizados para análise das características sensoriais e de irritação cutânea. Ainda, foram realizadas análises para estudar a estrutura dos hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas. **Resultados:** Observou-se que as nanocápsulas poliméricas e o hidrogel de quitosana conferem, de forma combinada, uma maior capacidade de adesão cutânea aos capsaicinóides, sendo que o efeito das nanocápsulas foi superior ao efeito da quitosana. Foi demonstrado que o veículo inovador proposto, composto de quitosana e nanocápsulas, não causa irritação cutânea em humanos e que a irritação cutânea causada pelos capsaicinóides, bem como

o fluxo de permeação destes através da epiderme, foram diminuídos devido à nanoencapsulação. Com relação à estrutura dos hidrogéis, os estudos permitiram evidenciar que as nanocápsulas encontram-se em aglomerados (redispersíveis até tamanho nanométrico) nos hidrogéis de quitosana. O sistema apresentou uma rede de gel bem desenvolvida, apesar da influência das nanopartículas na reticulação entre as cadeias de quitosana. Observou-se que as nanocápsulas somente são capazes de penetrar na pele quando esta se encontra lesada. Tanto a carga catiônica quanto o gel de quitosana apresentaram influência na penetração das partículas na pele. As nanocápsulas poliméricas brancas apresentaram toxicidade somente aos queratinócitos e somente após 24 e 48 h de contato, não estando relacionado à carga de superfície e à presença do gel de quitosana, mas provavelmente à presença do polisorbato 80. Estudos em membrana corioalanótide mostraram que as formulações não apresentam potencial irritante. O hidrogel de quitosana, independentemente da presença das nanocápsulas, apresentou maior pegajosidade imediata, maior formação de filme na pele e menor preferência em comparação aos hidrogéis de hidroxietilcelulose correspondente. Após a modificação, utilizando adjuvantes de uso cosmético, aumentou a aceitação e diminuiu a percepção do filme formado na pele. A presença das nanocápsulas apresentou pouca influência no sensorial do gel. Em relação ao estudo da encapsulação do óleo de rosa mosqueta foi possível otimizar a formulação e observou-se uma capacidade das nanocápsulas em proteger o óleo vegetal contra degradação frente à luz ultravioleta. O hidrogel de quitosana incorporando as nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta apresentou características adequadas, mantendo o tamanho nanométrico e reduzindo a cremagem observada quando em suspensão aquosa. **Conclusão:** Os hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas apresentaram interessantes propriedades cutâneas, como adesão cutânea, baixa toxicidade à pele e ausência de potencial irritante, sensorial passível de ser aprimorado, além de diminuir a irritação, modular a permeação e proteger contra degradação das substâncias encapsuladas. Tais propriedades os tornam veículos promissores para a veiculação de diversas substâncias dermatológicas e cosméticas.

Palavras-chave: nanocápsulas poliméricas, hidrogel, quitosana, capsaicinóides, óleo de rosa mosqueta, adesão cutânea, permeação cutânea, irritação cutânea, citotoxicidade, análise sensorial.

ABSTRACT

Determination of the structure and evaluation of the cutaneous properties of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules

Introduction and Objectives: Chitosan hydrogels present a great applicability in the pharmaceutical area. Their combination with nanometric drug carrier systems may represent the unification of distinct advantages such as bioadhesion, film formation and wound healing promotion, due to chitosan, and the controlled release, a more effective action and protection against drug degradation, due to the nanocapsules. The present work aimed to determine the structure and the cutaneous properties (bioadhesion, sensorial, penetration/permeation, cytotoxicity and irritation) of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules, besides determining the influence of the nanoparticles on the skin irritation and permeation of the capsaicinoids. Additionally, this work aimed to develop a skin regenerating hydrogel based on chitosan and rose-hip oil.

Methodologies: For obtaining the nanocapsule [blank, fluorescent or drug-loaded (capsaicin or rose-hip oil), the interfacial deposition of pre-formed polymer method was applied, using acrylic polymers (Eudragit®). The nanocapsules and the chitosan or the hydroxyethyl cellulose hydrogels (used as control) were characterized using several techniques. Skin bioadhesion and permeation/penetration were performed *in vitro*, using pig and human skin in usual and/or modified Franz cells, as well as lipoperoxidation studies, to study *in vitro* the oxidation process of the oily core of vegetable origin. *In vitro* toxicity studies were performed with primary skin cells (keratinocytes and fibroblasts) and corioallantoic membrane obtained from embrionated eggs. Studies in humans were also performed in order to evaluate the sensorial and the skin irritation properties. Additionally, several analyzes were performed to study the structure of the chitosan hydrogels containing nanocapsules. **Results:** It was observed that the nanocapsules and the chitosan hydrogel contributed to the skin adhesion of the formulation, in a way that the nanocapsules influence was higher compared to the influence of the biopolymer. The innovative vehicle proposed, composed of chitosan and nanocapsules, did not cause skin irritation in humans and the irritation caused by the capsaicinoids, as well as the flux of permeation across the epidermis, was decreased due the nanoencapsulation. Regarding the hydrogels structure, the studies evidenced that the nanocapsules are probably in

agglomerates (quickly redispersed into the primary particle size) in the chitosan hydrogels. The proposed innovative system presented a well structured gel network, despite the nanocapsules influence on the crosslinking between chitosan chains. It was observed that the nanocapsules are capable of penetrating the skin when this tissue is harmed. The cationic charge and the chitosan gel influenced the skin penetration of the nanoparticles. The nanoparticles presented toxicity only to the keratinocytes and after 24h and 48h of contact, in a way that neither the surface charge nor the presence of the chitosan gel presented influence, which may be related to the presence of polysorbate 80. Studies applying coriallantoic membrane showed that the formulations presented no irritation potencial. The chitosan hydrogel, despite the presence of nanoparticles, presented higher immediate stickiness and film formation on the skin and lower preference compared to the hydroxyethyl cellulose correspondent hydrogels. After a gel modification, by the additon of cosmetic adjuvants, the acceptance increased while the perception of film formation on the skin reduced. The presence of nanocapsules presented low influence on the sensory of the gel. Regarding the rose-hip oil nanoencapsulation, it was possibile to optimize the formulation and to observe a capacity of the nanocapsules in protecting the rose-hip oil from degradation under ultraviolet light. The chitosan hydrogel incorporating the rose-hip oil loaded nanocapsules was an adequate proposal, mantaining the nanometrical particles sizes and reducing the nanoparticles creaming observed when in aqueous suspension. **Conclusion:** The chitosan hydrogels containing nanocapsules presented interesting cutaneous properties, such as skin adhesion, low toxicity to skin and no irritation potential, possibility of a suitable sensory, besides decreasing the irritation, modulating the permeation and protecting against degradation of encapsulated substances. Those properties turn them into promising vehicles to carry dermatological and cosmetic substances.

Key-words: polymeric nanocapsules, hydrogel, chitosan, capsaicinoids, rose-hip oil, skin adhesion, skin permeation, skin irritation, cytotoxicity, sensory analysis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura química da quitina e do derivado desacetilado.....	35
Figura 2. Estrutura química da capsaicina e da diidrocapsaicina.....	43

CAPÍTULO I

Figure 1. Mechanisms of transport across the skin.....	54
Figure 2. Diffusion cells used in permeation/penetration studies	57
Figure 3. Microscopy images to locate particles in the skin.....	58
Figure 4. Articles which studied the skin penetration/permeation of encapsulated substances or nanoparticles	62

CAPÍTULO II

Figure 1. Skin structure.....	100
Figure 2. Main pathways for skin penetration and factors that interfere in the process.....	103
Figure 3. Expected penetration of nanoparticles into the skin.....	116

CAPÍTULO III

Figure 1. Transmission electron microscopy image of nanocapsules.....	138
Figure 2. Flow curves of hydrogels.....	139
Figure 3. Size distributions of hydrogels	140
Figure 4. Washability profiles of capsaicin and dihydrocapsaicin.....	142
Figure 5. Scanning electron microscopy images of the skin surface.....	145
Figure 6. Skin penetration and permeation of capsaicinoids after skin washing...	146
Figure 7. Skin penetration and permeation of capsaicinoids without skin washing	148
Figure 8. Percentage of capsaicinoids washed away and found in the excess of formulation, in the skin layers or in the receptor fluid.....	150

CAPÍTULO IV

Figure 1. Viscosity as a function of shear rate of formulations.....	170
Figure 2. Size distribution analyses of chitosan hydrogels containing	

nanocapsules.....	172
Figure 3. Skin erythema measured by the electronic probe.....	173
Figure 4. Skin erythema measured by visual scale.....	174
Figure 5. Volunteers arms at 90 minutes after application of formulations.....	176
Figure 6. Skin pH and water loss measured by the electronic probe.....	177
Figure 7. Skin permeation of capsaicinoids incorporated in different semi-solids formulations.....	180

CAPÍTULO V

Figure 1. Size distribution of chitosan hydrogels	198
Figure 2. Light backscattering analyses of chitosan hydrogels	200
Figure 3. Shear viscosity as a function of shear rate for the chitosan hydrogels ..	201
Figure 4. Storage / Loss moduli and Loss tangent for the chitosan hydrogels.....	203
Figure 5. FT-IR spectra of chitosan hydrogels, Eudragit RS 100 [®] and chitosan...	207
Figure 6. DSC thermograms for chitosan hydrogels, Eudragit RS 100 [®] and chitosan	208
Figure 7. Scanning electron microscopy images of chitosan films.....	209
Figure 8. Proposed structure of chitosan hydrogels.....	210

CAPÍTULO VI

Figure 1. Skin penetration of fluorescent nanocapsules into intact skin.....	232
Figure 2. Analysis of the fluorescence intensity detected in the intact skin.....	233
Figure 3. Skin penetration of fluorescent nanocapsules into harmed skin.....	235
Figure 4. Analysis of the fluorescence intensity detected in the harmed skin.....	236
Figure 5. Cytotoxicity of nanocapsules in contact with keratinocytes.....	238
Figure 6. Cytotoxicity of nanocapsules in contact with fibroblasts.....	240
Figure 7. Keratinocytes uptake of fluorescent nanocapsules.....	241
Figure 8. Fibroblasts uptake of fluorescent nanocapsules.....	242
Figure 9. Irritation potential of nanocapsules determined on choriollantoic membrane.....	245

CAPÍTULO VII

Figure 1. Size distribution analyzes by laser diffraction.....	265
--	-----

Figure 2. Transmission electron microscopy images of formulations.....	266
Figure 3. Rheological profiles of formulations	267
Figure 4. Attributes showing statistical differences in the Phase I sensory study.	272
Figure 5. Attributes showing statistical differences in the Phase II sensory study.	278

CAPÍTULO VIII

Figure 1. SPAN values, percentage of microparticles and average diameters.....	294
Figure 2. Delta backscattering obtained for rose-hip oil- loaded nanocapsule aqueous suspension.....	298
Figure 3. Malondhyaldheyde vs. time under UVA and UVC light.....	300
Figure 4. Size distribution obtained for chitosan gel containing rose-hip oil- loaded nanocapsule aqueous suspension.....	301
Figure 5. Rheological profile of chitosan gel containing rose-hip oil- loaded nanocapsule aqueous suspension.....	302
Figure 6. Delta backscattering obtained for chitosan gel containing rose-hip oil- loaded nanocapsule aqueous suspension.....	303

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Overview of permeation and/or penetration studies applying nanoparticles based on polymeric compounds.....	64
Table 2. Overview of permeation and/or penetration studies applying nanoparticles based on lipid compounds.....	71
Table 3. Overview of the methodology used in the permeation and/or penetration studies applying nanoparticles based on inorganic compounds.....	76

CAPÍTULO II

Table 1. Modifying the drug transport across the skin.....	107
--	-----

CAPÍTULO III

Table 1. Composition of the hydrogels	132
Table 2. Properties of the hydrogels	139
Table 3. Rate constants (k), correlation coefficients and MSC obtained by fitting capsaicin and dihydrocapsaicin washability profiles to the zero-order and first order monoexponential equations.....	143

CAPÍTULO IV

Table 1. Composition of the hydrogels	164
Table 2. Sensory analysis of the skin irritation.....	178
Table 3. Permeation parameters of capsaicinoids from different semi-solids formulations.....	181

CAPÍTULO V

Table 1. Composition of chitosan hydrogels	194
--	-----

CAPÍTULO VI

Table 1. Components of nanocapsule suspensions.....	223
Table 2. Physicochemical characterization of nanocapsule suspensions.....	229

CAPÍTULO VII

Table 1. Components of hydrogels	261
Table 2. Responses from the volunteers when comparing the paired samples in the Phase I sensory study	269
Table 3. P-values obtained from qui-square test for Phase I sensory study (comparison between volunteers who saw differences with volunteers who did not see differences among formulations)	271
Table 4. P-values obtained from qui-square test for Phase I sensory study (comparison between volunteers who chose one or another formulation from the paired analyses)	271
Table 5. Responses from the volunteers when comparing the paired samples in the Phase II sensory study	275
Table 6. P-values obtained from qui-square test for Phase II sensory study (comparison between volunteers who saw differences with volunteers who did not see differences among formulations)	276
Table 7. P-values obtained from qui-square test for Phase II sensory study (comparison between volunteers who chose one or another formulation from the paired analyses)	277

CAPÍTULO VIII

Table 1. Composition of nanocapsule aqueous suspensions.....	291
Table 2. P-values obtained for the factorial alone or combined.....	295

SUMÁRIO

1. <i>INTRODUÇÃO</i>	25
2. <i>OBJETIVOS</i>	29
3. <i>REVISÃO</i>	33
3.1. Hidrogéis de quitosana.....	35
3.2. Nanocápsulas e aplicação cutânea.....	39
3.3. Toxicidade relacionada ao uso cutâneo de nanopartículas.....	41
3.4. Capsaicinóides.....	42
3.5. Óleo de Rosa Mosqueta.....	44
4. CAPÍTULO I. Transport of substances and nanoparticles across the skin and <i>in vitro</i> models to evaluate skin permeation and/or penetration	47
Apresentação.....	49
Abstract.....	51
4.1. Introduction.....	52
4.2. Transport across the skin.....	53
4.3. <i>In vitro</i> models and membranes to evaluate the skin permeation/penetration	54
4.4. Transport of nanoparticles and encapsulated substances across the skin.....	69
4.5. Concluding remarks.....	80
4.6. References.....	80
5. CAPÍTULO II. Drug transport across the skin	95
Apresentação.....	97
Abstract.....	99
5.1. Introduction.....	100
5.2. Factors influencing the transport across the skin.....	102
5.3. Determining the drug transport across the skin.....	105
5.4. Modifying the drug transport across the skin.....	106
5.5 Concluding remarks.....	116
5.6. References.....	117

6. <i>CAPÍTULO III. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface</i>	123
Apresentação.....	125
Abstract.....	127
6.1. Introduction.....	128
6.2. Materials and Methods.....	129
6.3. Results and Discussion.....	137
6.4 Conclusion.....	152
6.5 References.....	153
7. <i>CAPÍTULO IV. Decreased irritation of capsaicinoids to human skin by means of nanoencapsulation</i>	157
Apresentação.....	159
Abstract.....	161
7.1. Introduction.....	162
7.2. Materials and Methods.....	163
7.3. Results and Discussion.....	169
7.4 Conclusion.....	183
7.5 References.....	183
8. <i>CAPÍTULO V. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules</i>.....	187
Apresentação.....	189
Abstract.....	191
8.1. Introduction.....	192
8.2. Materials and Methods.....	193
8.3. Results and Discussion.....	196
8.4 Conclusion.....	210
8.5 References.....	211
9. <i>CAPÍTULO VI. Dermal toxicity of acrylic-based cationic nanocapsules: Analysis of the influence of the surface charge and the chitosan gel used</i>	

as vehicle	215
Apresentação.....	217
Abstract.....	219
9.1 Introduction.....	220
9.2 Materials and Methods.....	222
9.3 Results and Discussion.....	229
9.4 Conclusion.....	246
9.5 References.....	246
10. <i>CAPÍTULO VII. Applying the sensory analysis in the development of a chitosan hydrogel containing polymeric nanocapsules for cutaneous use</i>	253
Apresentação.....	255
Abstract.....	257
10.1. Introduction.....	258
10.2. Materials and Methods.....	259
10.3. Results and Discussion.....	264
10.4 Conclusion.....	279
10.5 References.....	280
11. <i>CAPÍTULO VIII. Nanoencapsulation of rose-hip oil: technological aspects, <i>in vitro</i> oxidation study and obtainment of a final formulation for cutaneous use</i>	283
Apresentação.....	285
Abstract.....	287
11.1. Introduction.....	288
11.2. Materials and Methods.....	289
11.3. Results and Discussion.....	293
11.4 Conclusion.....	303
11.5 References.....	303
12. <i>DISCUSSÃO GERAL</i>	

13. <i>CONCLUSÕES</i>	317
14. <i>REFERÊNCIAS</i>	321
15. <i>BIOGRAFIA</i>	331
<i>ANEXOS</i>	337

1. INTRODUÇÃO



A quitosana é o único polímero catiônico de origem natural e apresenta importantes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade, o que tem gerado um crescente interesse por este biopolímero em diversas áreas de pesquisa (RAVI KUMAR *et al.*, 2000; RINAUDO, 2006; JAYAKUMAR *et al.*, 2010; MOHAMMED *et al.*, 2010; NGAH *et al.*, 2011). Os hidrogéis obtidos a partir da quitosana apresentam diversas aplicações na área farmacêutica, para diferentes vias de administração, como a liberação controlada de fármacos através da via oral, nasal e intramuscular. Devido às interessantes propriedades como formador de filme, efeito bacteriostático, promotor de regeneração da pele e promotor da permeação cutânea, tais hidrogéis apresentam grande potencialidade para aplicação sobre a pele e as mucosas (BERGER *et al.*, 2004A, BERGER *et al.*; 2004B; BHATTARAI *et al.*, 2010). Por sua vez, as nanopartículas apresentam uma enorme potencialidade tanto para a veiculação de ativos de aplicação cutânea quanto para outras vias de administração de fármacos. Considerando a aplicação na pele, podem ser citadas vantagens como a diminuição da irritação e da alergenicidade cutânea, da degradação do fármaco, bem como a melhora do sensorial das formulações. A liberação controlada pode diminuir a necessidade de repetidas aplicações, bem como aumentar a quantidade de fármaco disponível no local de ação desejado (GUTERRES *et al.*, 2007).

A incorporação de sistemas de liberação controlada nanoparticulados em hidrogéis e filmes de quitosana visando à aplicação cutânea é de grande potencialidade, pois conjuga as vantagens dos dois sistemas. O hidrogel de quitosana, devido a sua propriedade de bioadesividade e formação de filme, apresenta potencial para uma liberação homogênea e prolongada do fármaco. As nanocápsulas, por sua vez, levam a uma liberação controlada e prolongada, além de promoverem proteção a fármacos lábeis (SHAFFAZICK *et al.*, 2003; VALENTA e AUNER, 2004). A incorporação de lipossomas (RUEL-GARIÉPY *et al.*, 2002), de nanopartículas lipídicas (SOUTO *et al.*, 2004) e de quitossomas (LIONZO *et al.*, 2010) em hidrogéis de quitosana já foi descrita.

Recentemente foi proposto por nosso grupo de pesquisa um hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas. Os hidrogéis apresentaram características adequadas para aplicação cutânea, tendo sido observado um controle da liberação dos ativos (capsaicinóides) a partir da formulação devido à

presença das nanocápsulas (CONTRI *et al.*, 2010). Os capsaicinóides são substâncias obtidas das pimentas, representadas principalmente por capsaicina e diidrocapsaicina. Após aplicações repetidas de tais substâncias na pele, há o aparecimento do efeito analgésico local (KNOTKOVA *et al.*, 2008). Os capsaicinóides apresentam grande potencial de irritação cutânea, além do fato que diversas aplicações são necessárias para o efeito desejado, justificando, desta forma, a sua nanoencapsulação.

O óleo de rosa mosqueta, óleo vegetal utilizado para acelerar a regeneração cutânea (PAREJA e KEHL, 1990; DWECK, 2001; EURIDES *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2007), apresenta características que, assim como os capsaicinóides, justificariam sua nanoencapsulação. A tendência à degradação oxidativa e a dificuldade de incorporação em formas farmacêuticas não-oleosas, como os hidrogéis, são características que podem ser otimizadas através do uso da nanoencapsulação. Além disso, as nanocápsulas poderiam promover a liberação controlada dos ativos presentes no óleo devido a sua característica de reservatório (JÄGER *et al.*, 2007). Adicionalmente, o hidrogel de quitosana se apresenta como uma alternativa interessante para carrear tais nanocápsulas, devido à grande adesividade cutânea e à capacidade de formação de filme, aliada às propriedades cicatrizantes da quitosana (RINAUDO, 2006).

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a determinação da estrutura e das propriedades cutâneas (bioadesividade, penetração, irritação, citotoxicidade e sensorial) de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, além de determinar a influência das nanopartículas na irritação e na permeação cutânea de capsaicinóides. Adicionalmente, o trabalho também visa desenvolver um hidrogel regenerador da pele, a partir da quitosana e de óleo de rosa mosqueta. Após a descrição dos objetivos deste trabalho, a presente tese de doutorado traz uma revisão do tema e, na sequência, os métodos e resultados experimentais, que foram organizados em capítulos sequenciais. Os dois primeiros correspondem a capítulos de livros já publicados ou em processo para publicação, abordando assuntos importantes para a realização deste trabalho (permeação cutânea de substâncias e de sistemas nanoestruturados). Os capítulos seguintes referem-se aos artigos científicos, relacionados aos temas específicos desta tese. Encontram-se aceitos para publicação os capítulos III e IV e prontos para submissão os capítulos V, VI, VII e VIII.

2. OBJETIVOS



2.1 Objetivo geral

Determinar a estrutura e avaliar as propriedades cutâneas (bioadesividade, penetração, irritação, citotoxicidade e sensorial) de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas.

2.2 Objetivos específicos

- Revisar o transporte de substâncias através da pele, revisar os modelos para estudo *in vitro* de permeação cutânea e os resultados já descritos referente aos estudos de permeação/penetração de nanopartículas ou substâncias nanoencapsuladas.
- Estudar a bioadesividade de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, correlacionando estes dados com dados de permeação cutânea.
- Estudar o potencial de irritação cutânea em humanos de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas, determinar a influência das nanocápsulas na irritação cutânea causada pelos capsaicinóides, correlacionando estes dados com dados de permeação cutânea.
- Estudar a estrutura de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas determinando a influência das nanopartículas na rede do hidrogel.
- Estudar aspectos relacionados à nanotoxicidade (penetração cutânea, citotoxicidade, captação celular, potencial irritante) da formulação composta de nanocápsulas poliméricas e hidrogel de quitosana.
- Estudar a possível aplicação cosmética de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, através de análise sensorial.
- Desenvolver uma formulação com propriedades de regeneração cutânea a base de quitosana e de nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3.1 Hidrogéis de quitosana

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais que absorvem grandes quantidades de água enquanto permanecem insolúveis devido a interligações entre as cadeias individuais do polímero (LIN e METTERS, 2006). Hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos ou, ainda, podem ser uma combinação de ambos (HIN, 2004). Entre os polímeros naturais mais usados na preparação de hidrogéis pode-se citar o alginato de cálcio e sódio, o colágeno, a gelatina, o ácido hialurônico, a goma xantana e a quitosana (LIN e METTERS, 2006).

A quitina (Fig. 1a), polissacarídeo de β -D-glicose contendo grupamentos amino na sua estrutura, é um componente estrutural-chave de helmintos, artrópodes e fungos. É o segundo polímero biológico mais abundante no planeta e o exoesqueleto dos crustáceos marinhos é a sua principal fonte industrial (VÅRUM e SMIDSRØD, 2005). Quando a desacetilação alcalina da quitina (Fig 1b) alcança um grau de 50% (dependendo da origem do polímero), se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado de quitosana. A quitosana é o único polímero pseudonatural catiônico e apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, atividade bacteriostática e capacidade de formação de filme e de regeneração de tecidos lesados. Este biopolímero apresenta aplicações nas áreas biomédicas, de cosméticos, de tecnologia alimentícia e de tecnologia farmacêutica (RAVI KUMAR *et al.*, 2000; RINAUDO, 2006).

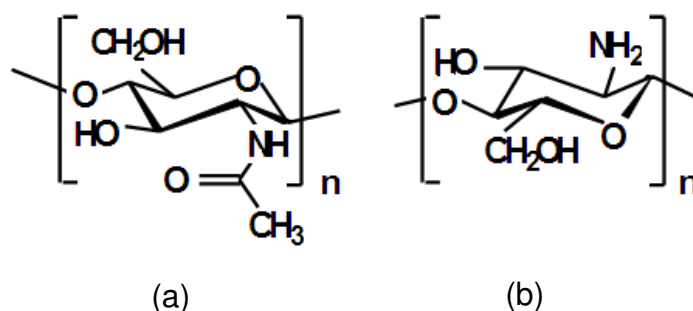


Figura 1. Representação da estrutura química (a) da quitina e (b) de seu derivado desacetilado.

A partir de interligações entre as cadeias da quitosana é possível a obtenção de hidrogéis. Nos hidrogéis de quitosana obtidos através da

solubilização do biopolímero em meio aquoso ácido, e posterior agitação, interações secundárias são estabelecidas entre as cadeias do polímero. Hidrogéis de quitosana também podem ser formados a partir de reticulantes entre as cadeias de quitosana, a partir de complexos com outros polímeros e a partir do uso de quitosana quimicamente modificada, possuindo características diferenciadas a depender da estratégia escolhida.

Complexos de polieletrólitos e hidrogéis de quitosana enxertados são exemplos de hidrogéis de quitosana que não requerem um reticulante entre as cadeias poliméricas. No primeiro tipo, ocorre interação eletrostática entre as cadeias da quitosana e de um polímero aniônico (BERGER *et al.*, 2004A). A regeneração da pele lesada é uma das aplicações de tais complexos (MARTINEZ-RUVALCABA *et al.*, 2007). No segundo, os grupamentos amino livres nas unidades desacetiladas e os grupamentos hidroxila nas unidades acetiladas e desacetiladas são ligados covalentemente a moléculas funcionais com posterior ocorrência de interações levando à formação de uma rede por agregação (BERGER *et al.*, 2004B). Tais hidrogéis enxertados podem apresentar características diferenciadas, como maior atividade bacteriostática ou maior sensibilidade a variações de temperatura, dependendo das moléculas funcionais ligadas à cadeia polimérica (VALENTA *et al.*, 2002, BERGER *et al.*, 2004B).

É possível também, como previamente mencionado, a obtenção de hidrogéis através de ligação física ou química entre as cadeias poliméricas da quitosana. Nos géis covalentemente interligados ocorre uma interação irreversível que leva à formação de uma rede porosa e permanente. Entretanto, efeitos tóxicos como mutagenicidade e neurotoxicidade, devido aos dialdeídos livres restantes após processo de purificação, podem ser induzidos com a utilização de reticulantes como glutaraldeído e glicoxal. Sistemas transdérmicos e microesferas de gel são aplicações de tais hidrogéis covalentemente reticulados (MI *et al.*, 2000, BERGER *et al.*, 2004A). Por outro lado, os hidrogéis formados por ligações iônicas reversíveis levam à obtenção de redes porosas e sensíveis a variações de pH e de temperatura. Estes sistemas são capazes de propiciar a liberação controlada de fármacos, de forma dependente do pH ou de temperatura. Os reticulantes iônicos mais usados são os ânions metálicos, β -

glicerol-fosfato e tripolifosfato (CHENITE *et al.*, 2001; BERGER *et al.*, 2004A; KEMPE *et al.*, 2007).

Diversas são as aplicações farmacêuticas dos hidrogéis de quitosana. Entre elas, os sistemas que sofrem transição entre os estados sol e gel devido a variações de temperatura ou pH têm despertado o interesse por parte dos pesquisadores (RUEL-GARIÉPY e LEROUX, 2004). Kempe e colaboradores (2007) estudaram as micro- e macroestrutura de soluções de quitosana que gelificam à temperatura corporal formando implantes para liberação controlada de proteínas. Um sistema injetável para liberação local de fármacos antitumorais foi desenvolvido por Han e colaboradores (2007). Chen e colaboradores (2004) desenvolveram um hidrogel sensível ao pH para administração oral de proteínas. Um hidrogel termosensível de quitosana quaternizada para administração nasal capaz de diminuir a taxa de depuração ciliar nasal e aumentar a absorção da insulina de maneira controlada foi desenvolvido por Wu e colaboradores (2007). Neste trabalho foi demonstrada a capacidade da quitosana de abrir as junções entre as células epiteliais, chamadas *tight junctions*. Uma vez que tais junções também se encontram na pele, é possível que a quitosana aumente a penetração percutânea de substâncias pelo mesmo mecanismo (VALENTA e AUNER, 2004).

A incorporação de sistemas de liberação controlada nanoparticulados em hidrogéis de quitosana é de grande potencialidade, pois representa a associação inovadora de dois sistemas distintos. O hidrogel de quitosana, devido à capacidade de formação de filme e bioadesividade deste biopolímero, garante uma liberação homogênea e prolongada, além da interessante capacidade da quitosana de propiciar abertura das junções entre as células epiteliais (WU *et al.*, 2007), o que pode permitir maior penetração do fármaco através da pele (VALENTA e AUNER, 2004). Por sua vez, as nanocápsulas garantem uma liberação controlada e prolongada da substância (SHAFFAZICK *et al.*, 2003), bem como uma possível diminuição da irritabilidade da pele às substâncias aplicadas, como já descrito para outros tipos de nanopartículas (SHAH *et al.*, 2007; CASTRO *et al.* 2009; POPLE *et al.*, 2010)

Nanopartículas lipídicas sólidas (SOUTO *et al.*, 2004), lipossomas (RUÉL-GARIÉPY *et al.*, 2002), niossomas (LAKSHMI *et al.*, 2007) e quitossomas (LIONZO *et al.*, 2010) já foram incorporados em hidrogéis de quitosana. Souto e

colaboradores (2004) prepararam e caracterizaram fisicamente nanopartículas lipídicas sólidas quanto ao tamanho de partícula e potencial zeta. Após, as nanoestruturas foram incorporadas em diversos hidrogéis. Observou-se que o potencial zeta das nanoestruturas foi invertido após a incorporação no gel de quitosana, devido ao caráter catiônico do biopolímero. Esta inversão de potencial pode acarretar em instabilidade no momento de carga zero, e facilitar a agregação das partículas, como observado após análise do tamanho das partículas. Ruel-Gariépy e colaboradores (2002) incorporaram lipossomas em um hidrogel de quitosana termosensível para reparação tecidual e liberação local de fármacos antitumorais. A taxa de gelificação e a força do gel foram intensamente aumentadas pela presença dos lipossomas. Estudos de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos lipossomas contidos no gel demonstraram liberação controlada por pelo menos duas semanas. Mais recentemente, Lakshmi e colaboradores (2007) incorporaram metotrexato em lipossomas com intuito de impedir a toxicidade sistêmica provocada pelo fármaco. Estes foram incorporados em hidrogel de quitosana. O resultado comprovou a maior eficácia do gel testado em relação ao gel comercial. O resultado está relacionado ao sistema carreador do fármaco e à quitosana que promove absorção, provavelmente por melhora da adesão entre os tecidos e a formulação, mas também devido a sua ação no processo de transporte paracelular. Lionzo e colaboradores (2010) observaram que a presença de quitossomas (lipossomas revestidos por quitosana) negativamente carregados (condroitina) levaram a um aumento da viscosidade do gel de quitosana, devido a uma interação entre as nanopartículas revestidas e a quitosana.

Em trabalho que deu origem a presente tese, foi desenvolvido um hidrogel de quitosana inovador contendo nanocápsulas poliméricas (CONTRI *et al.*, 2010). O hidrogel apresentou valores de pH próximos a 4,5, como consequência da adição do ácido láctico, valores considerados adequados para aplicação cutânea. A presença das nanocápsulas levou a um leve aumento da consistência dos hidrogéis, índices obtidos através do modelo de fluxo de Ostwald, que representa um fluxo pseudoplástico. O estudo de liberação mostrou que a liberação controlada dos capsaicinóides a partir dos hidrogéis contendo nanocápsulas, quando comparada a hidrogéis contendo o fármaco livre, solubilizado na forma de micelas ou através de solvente orgânico.

3.2 Nanocápsulas e aplicação cutânea

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos. Tais sistemas carreadores de fármacos podem ser micropartículas ou sistemas coloidais como lipossomas, nanopartículas poliméricas ou nanopartículas lipídicas sólidas. Nanopartículas poliméricas incluem nanocápsulas e nanoesferas. As primeiras se caracterizam pela presença de um núcleo oleoso, envolto por uma parede de polímero. As nanocápsulas poliméricas podem servir de reservatório para fármacos lipofílicos, prolongando o efeito por retardar a liberação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas, juntamente com outras nanopartículas, apresentam grande aplicabilidade para a via tópica. As nanocápsulas para aplicação cutânea são preparadas a partir de um polímero e de um óleo biocompatíveis e apresentam diâmetro entre 200 e 300 nm. São geralmente preparadas por técnicas de deposição interfacial do polímero pré-formado ou emulsificação-difusão. Exemplos de polímeros utilizados incluem a poli (ϵ -caprolactona) e a quitosana, enquanto o núcleo oleoso é frequentemente composto de triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (GUTERRES *et al.*, 2007). A encapsulação através da solubilização no núcleo oleoso ou da adsorção na parede polimérica, já foi descrita com sucesso para filtros solares (ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2004, PAESE *et al.*, 2009, SIQUEIRA *et al.*, 2011), agentes antimicrobianos (LBOUTOUNNE *et al.*, 2002), anti-inflamatórios (FONTANA *et al.*, 2009), antioxidantes (KÜLKAMP *et al.*, 2009; TERROSO *et al.*, 2010) e antiproliferativos (VENTURINI *et al.*, 2011), entre outros.

Substâncias lipofílicas que apresentam propriedades para aplicação cutânea, como filtros solares, óleos vegetais e vitaminas, estão sendo propostos para compor o núcleo oleoso de nanocápsulas (ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2009, SILVA *et al.*, 2010; CONTRI *et al.*, 2013). Alvarez-Roman e colaboradores (2001) encapsularam metoxicinamato de octila em nanocápsulas poliméricas reduzindo o eritema formado na pele devido à radiação UVB. Silva e colaboradores (2013) encapsularam vitamina K em nanocápsulas poliméricas e, através de estudos com pele de porco e célula de Franz, verificaram o controle a permeação de forma a reter maior quantidade de

fármaco na derme, sem haver permeação até o receptor. Almeida e colaboradores (2009) prepararam e caracterizaram nanocápsulas contendo óleo de semente de uva e óleo de amêndoas, enquanto Contri e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas com propriedades catiônicas contendo óleo de cenoura, de oliva, de semente de girassol, de semente de uva, de castanha do Brasil e de rosa mosqueta. As propriedades de tais formulações foram determinadas e comparadas com uma formulação preparada com triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico como núcleo. Observou-se, para as nanocápsulas contendo óleos vegetais como núcleo, uma maior tendência à cremagem das partículas e maiores diâmetros médios e valores de SPAN, indicando menor homogeneidade das partículas. Tais diferenças estão provavelmente relacionadas com as maiores viscosidade e menores densidades dos óleos vegetais em relação aos triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (CONTRI *et al.*, 2013).

Em síntese, diversas são as vantagens da aplicação cutânea de substâncias ativas quando nanoencapsuladas. Entre elas, pode-se citar uma grande adesividade cutânea (GUTERRES *et al.*, 2007), possível diminuição da irritação e da alergenicidade cutânea (SHAH *et al.*, 2009; POPLE *et al.*, 2010), possível diminuição da degradação do fármaco (OURIQUE *et al.*, 2008; WEISS-ANGELI *et al.*, 2008; KÜLKAMP *et al.*, 2009), bem como possíveis melhoras do sensorial como diminuição de odores desagradáveis (KÜLKAMP-GUERREIRO *et al.*, 2013).

A liberação controlada proporcionada pela característica de reservatório das partículas pode modular a permeação, diminuindo a necessidade de aplicações repetidas, ou aumentando a quantidade de fármaco disponível no local de ação desejado (GUTERRES *et al.*, 2007). Em relação à penetração das partículas na pele, já há evidências que partículas de mais de 10 nm de diâmetro não são capazes de atravessar o estrato córneo e que elas tendem a se acumular em folículos pilosos (PROW *et al.*, 2011).

A aplicação de produtos tópicos está ligada à viscosidade do produto final. Produtos de baixa viscosidade são difíceis de aplicar e há perda do produto. Trabalhos recentes têm se dedicado à incorporação de nanocápsulas em veículos semissólidos e a sua caracterização reológica (ALVES *et al.*, 2007; PAESE, *et al.*, 2009). A reologia é a parte da físico-química que trata da

deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semissólidos. A caracterização reológica dos fluidos semissólidos permite conclusões a respeito da espalhabilidade do produto na pele, da fluidez, e do sensorial, entre outras características importantes no desenvolvimento tecnológico (ORTEGA e NETZ, 2002). No que se refere ao comportamento reológico de semissólidos contendo sistemas nanoestruturados como lipossomas, nanocápsulas e nanoesferas, estes geralmente apresentam um comportamento não newtoniano pseudoplástico ou plástico. Tais comportamentos são caracterizados por uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento aplicada. Porém, o que os diferencia é a necessidade que os fluidos plásticos apresentam de uma força prévia para começar a fluir. O comportamento pseudoplástico é o mais comumente atribuído para géis e emulsões de uso farmacêutico e cosmético (ALVES, 2006).

3.3 Toxicidade relacionada ao uso cutâneo de nanopartículas

Nanomateriais e nanopartículas geralmente possuem propriedades físico-químicas não usuais, devido ao seu tamanho, composição química, superfície, solubilidade, forma e agregação (ARORA, 2012). Devido à crescente exposição pública a estes materiais, que pode ser intencional ou não, testes confiáveis indicadores de toxicidade se tornam necessários (JONES e GRAINGER, 2009). A nanotoxicologia surgiu como uma novo tipo de toxicologia, uma das tecnologias-chave do século XXI, proposta para estudar os efeitos adversos causados pelos nanomateriais, objetivando uma nanotecnologia sustentável e segura (ARORA, 2012). Até o momento, existe pouca evidência que materiais nanoparticulados exibem maior toxicidade à pele e aos outros tecidos que o mesmo material quando não nanoparticulado (NOHYNEK *et al.*, 2008).

A pele é considerada como uma importante via de exposição de nanomateriais e nanopartículas (VEGA-VILLA *et al.*, 2008; ARORA, 2012). A maioria dos experimentos mostraram que as nanopartículas não são capazes de, passivamente, penetrar através do estrato córneo da pele humana, chegando às camadas contendo células viáveis (epiderme e derme) (SCHNEIDER *et al.*, 2009). Porém, até partículas maiores que 1 μm demonstraram capacidade de penetração, quando pele lesada foi testada ou quando aplicou-se estimulação mecânica (VEGA-VILLA *et al.*, 2008;

SCHNEIDER, *et al.*, 2009). Os folículos pilosos são considerados um sítio para deposição de nanopartículas, que pode ser usado visando uma liberação sustentada de fármacos (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Se as nanopartículas conseguirem penetrar na pele, além da possível distribuição sistêmica e do contato com nervos cutâneos, algum tipo de efeito tóxico devido a interação com as células pode ser possível, como produção de espécies reativas de oxigênio, interação com organelas, como as mitocôndrias e os lisossomos, e com o núcleo, ou diminuição de viabilidade celular (BUZEA *et al.*, 2007; VEGA-VILLA *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* de nanotoxicidade, baseado no uso de células, incluem estudos de viabilidade celular, estudos de estresse celular e estudos de produção de espécies reativas de oxigênio, entre outros (JONES e GRAINGER, 2009). Os testes de viabilidade geralmente conferem uma idéia geral de biocompatibilidade das nanopartículas às células, sendo que geralmente envolvem a inclusão/exclusão ou conversão de um corante adicionado pelas células viáveis. Os principais testes de viabilidade incluem teste do vermelho neutro, do azul tripan, da lactato desidrogenase, os baseados em formazan, e os testes do tiobarbitúrico. Os testes de estresse celular, que estudam os efeitos não letais às células, incluem os testes de expressão gênica e protéica, os testes de liberação de mediadores de inflamação e os testes de visualização/captação celular. O processo de captação celular que é inerente à quase todas as células é a pinocitose. A visualização celular, por microscopia de transmissão de alta resolução, por exemplo, permite identificar a localização das nanopartículas dentro das células. Entre as células mais testadas em estudos *in vitro* de nanotoxicologia, estão as células epiteliais/endoteliais, que incluem as células cutâneas (queratinócitos e fibroblastos) (JONES e GRAINGER, 2009). Estudos de nanotoxicidade de produtos cutâneos também incluem estudos de sensibilização e irritação cutânea, bem como de irritação ocular (NOHYNEK *et al.*, 2008).

3.4 Capsaicinóides

Os capsaicinóides são as substâncias responsáveis pelo sabor picante das pimentas do gênero *Capsicum*. Os principais capsaicinóides, que juntos representam em torno de 90% do total, são chamados capsaicina e a diidrocapsaicina (Fig. 2). São substâncias com grande potencial irritante para a

pele e mucosas. A capsaicina e a diidrocapsaicina diferem apenas por uma ligação dupla presente na cadeia alifática da capsaicina [Fig.2(a)] que é um pouco menos lipofílica ($\log P = 3.5$) que a diidrocapsaicina ($\log P = 3.8$) (Fig2(b)) (HAYMAN e KAM, 2008), P representando o coeficiente de partição octanol/água.

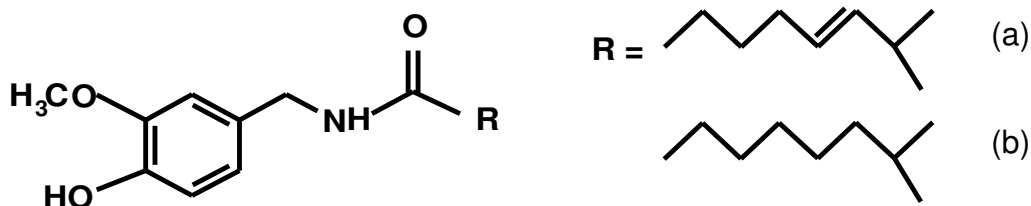


Figura 2. Estrutura química da (a) capsaicina e da (b) diidrocapsaicina.

A capsaicina é um fármaco analgésico usado topicamente no tratamento de dores de origem neuropática como osteoartrite, artrite reumatóide, neuropatia diabética e neuralgia pós-herpética, bem como no tratamento sintomático da psoríase (ZI *et al.*, 2008). Tal substância se liga a um receptor específico dos nervos periféricos, TRPV1, levando a um influxo de cálcio e liberação de neuropeptídeos inflamatórios, o que está associado com as propriedades irritantes da capsaicina. Além disso, a liberação aguda da substância P leva a uma hiperalgesia inicial, que com a continuidade do tratamento é seguida por depleção de tal substância. Após aplicações repetidas por período variável, o local apresenta diminuição da sensibilidade e bloqueio a estímulos dolorosos, resultando em dessensibilização (reversível com a suspensão de uso) ou lesão irreversível da fibra, dependendo das doses e da duração da exposição (ERIN *et al.*, 2008; HAYMAN e KAM, 2008).

A formulação comercial de capsaicina se encontra na forma de creme ou loção contendo 0,025 ou 0,075% de ativo. Recentemente, foi aprovado pela FDA um adesivo dérmico de capsaicina contendo altas concentrações de ativo (8%), para casos de neuralgia pós-herpética (<http://www.fda.gov>, acesso em setembro 2013). Em um estudo de fase III que antecedeu a aprovação, os principais efeitos adversos relatados foram eritema, dor e prurido durante ou logo após o

uso do adesivo. A incorporação deste fármaco em nanocápsulas, juntamente com a diidrocapsaicina que também apresenta ação analgésica tópica, representa, portanto, alternativa interessante para liberação controlada dos fármacos no local de ação, diminuindo o número repetido de aplicações necessárias e a irritabilidade provocada pelos capsaicinóides na pele, que frequentemente contribuem para o abandono do tratamento (BARCELOUX, 2008; KNOTKOVA *et al.*, 2008).

Suspensões de nanocápsulas contendo capsaicina foram previamente obtidas por métodos de coacervação simples e complexa sendo que a gelatina foi usada como material polimérico (XING *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008). Entretanto, os trabalhos trazem poucos dados sobre a liberação da substância ativa a partir das nanocápsulas obtidas, e o uso de gelatina para a produção de nanocápsulas é geralmente seguido do uso de um reticulante tóxico e, portanto, um novo passo de purificação se faz necessário. Buscando uma alternativa mais segura e prática, Contri e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas poliméricas contendo capsaicinóides (0,5 mg/mL) a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Utilizou-se o polímero catiônico Eudragit RS 100[®] como parede polimérica e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico como núcleo oleoso (CONTRI *et al.*, 2011). As nanopartículas apresentaram propriedades adequadas e foi observado um controle da liberação dos capsaicinóides quando nanoencapsulados, em comparação a uma nanoemulsão, preparada da mesma forma, porém omitindo-se o polímero, a uma solução micelar, preparada da mesma forma, porém omitindo-se o polímero e o óleo, e a uma solução hidroalcoólica dos capsaicinóides, na mesma concentração.

3.5 Óleo de rosa mosqueta

O óleo de rosa mosqueta é principalmente obtido das sementes da planta chamada de *Rosa rubiginosa*, encontrada na Europa Central e região dos Andes (FRANCO *et al.*, 2007). A planta, originária da área do Mediterrâneo e da Europa Central, foi trazida pelos colonizadores espanhóis para a América do Sul, e cresce na região sul e central do Chile como uma planta selvagem, em solos secos de baixo valor agrícola (SANTOS *et al.*, 2009). As sementes contêm cerca de 8% de óleo e a obtenção é feita através do uso de solventes seguido por uma

refinação via processos químicos, ou através de prensagem a frio e sem refinação química (AHUMADA, 2005).

O óleo vegetal em questão apresenta aspecto graxo não volátil e é altamente composto de ácidos graxos insaturados, principalmente os ácidos graxos linoleico (~50%), linolenico (~35%) e oleico (~15%). Também estão presentes, em menor proporção os ácidos palmítico (~5%) e esteárico (~3%), entre outros como láurico, mirístico, araquidônico, gadoleico e behênico. Os ácidos graxos essenciais (poliinsaturados) são componentes importantes das membranas celulares, conferindo permeabilidade e elasticidade. Correspondem aos lipídeos formadores da barreira da epiderme, sendo essenciais para a função de permeabilidade da pele. Além disso, são precursores de uma ampla gama de mediadores que controlam aspectos da função celular. São nutrientes da síntese de prostaglandinas, mecanismos de defesa, crescimento e outros processos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a regeneração de tecidos e com a proliferação de células. Também, regulam o nível de ceramidas na capa córnea (AHUMADA, 2005; SANTOS *et al.*, 2009).


Além dos ácidos graxos insaturados, há uma significativa quantidade de ácidos graxos saturados, minerais, fosfolipídeos, polifenóis e carotenóides. A capacidade antioxidante de alguns compostos como os polifenóis e os carotenóides reduz o risco de desenvolvimento de neoplasias, além de exercer efeito protetor contra o estresse oxidativo (SANTOS, 2009; FRANCO 2009). A presença do ácido transretinóico (até 0,1%) foi descrita em 1990 por Pareja e Kehl. Este constituinte foi descrito pelos autores como o responsável por algumas propriedades do óleo como anti-fotoenvelhecimento e melhoramento do tamanho e de cicatrizes casuais e cirúrgicas (PAREJA e KEHL, 1990).

A presença da tretinoína juntamente com os demais constituintes, faz com que o óleo se torne uma alternativa para acelerar a regeneração cutânea em diversos casos como ulceração, cicatrização e pigmentação (PAREJA e KEHL, 1990; EURIDES *et al.*, 2001; DWECK, 2001; FRANCO *et al.*, 2007). Seu uso, portanto inclui o tratamento de problemas dermatológicos bem como a aplicação cosmética.

A nanoencapsulação do óleo de rosa mosqueta foi previamente descrita por Contri e colaboradores (2013). Com base nas propriedades da nanoencapsulação, estima-se que esta estratégia possa levar a uma liberação

controlada dos ativos acima mencionados, além de proporcionar uma grande adesão cutânea da formulação, devido à grande área superficial das nanopartículas. Ainda, pode proteger o óleo da degradação oxidativa e facilitar a incorporação do óleo em formulações não oleosas, como os hidrogéis. A formulação já descrita apresentou distribuição majoritariamente nanométrica (diâmetro médio de 265 ± 18), com uma pequena porcentagem de partículas com tamanho médio acima de $1 \mu\text{m}$ e valores de SPAN de $2,62 \pm 0,36$. O pH descrito foi de $5,4 \pm 0,4$ e o potencial zeta de $+7,6 \pm 2,7$.

4. CAPÍTULO I



**TRANSPORT OF SUBSTANCES AND NANOPARTICLES ACROSS THE SKIN
AND IN VITRO MODELS TO EVALUATE SKIN PERMEATION AND/OR
PENETRATION**

Apresentação do Capítulo

O primeiro capítulo desta tese, intitulado em português “Transporte de substâncias e nanopartículas através da pele e modelos *in vitro* para avaliar a permeação ou penetração cutânea” foi publicado em 2012 no livro *Nanocosmetics and Nanomedicines- New Approaches for skin care* pela editora Springer. Este capítulo traz o uso da nanotecnologia na modificação da permeação e penetração de substâncias na pele, através da manipulação de diferentes fatores como o contato com a superfície cutânea e a liberação controlada dos ativos. Apesar de possuírem a capacidade de modular a penetração/permeação, em geral as nanopartículas em si não possuem capacidade de penetrar a barreira cutânea, devido a coesão celular e aos lipídeos do estrato córneo. Também são abordados os dispositivos utilizados para os estudos de transporte de substâncias através da pele, sendo que o mais comum é a célula de difusão vertical de Franz. A determinação das substâncias é realizada no líquido receptor da célula e nas camadas cutâneas. Técnicas microscópicas também estão sendo aplicadas nos experimentos. A redação do capítulo forneceu uma base importante para a execução e redação dos estudos de permeação/penetração cutânea dos capsaicinóides e das nanocápsulas poliméricas através da pele apresentados nos capítulos seguintes.

5. *CAPÍTULO II*



DRUG TRANSPORT ACROSS THE SKIN

Apresentação do Capítulo

O segundo capítulo desta tese, intitulado em português “Transporte de fármacos através da pele” está aceito para publicação no livro *Drug delivery across physiological barriers*, pela editora Pan Stanford (previsto para Dezembro de 2013). Este capítulo traz os processos de penetração de fármacos através da pele, bem como os fatores que influenciam e as principais formas de avaliar a penetração cutânea. Existem muitas estratégias sendo pesquisadas para aprimorar a aplicação de substâncias para as camadas viáveis da pele e para a circulação sanguínea. Entre elas, estão os promotores químicos de permeação cutânea e as técnicas físicas que são aplicadas em consultórios e clínicas. Ultimamente, devido às limitações das técnicas mencionadas, as nanopartículas compostas baseadas em lipídeos ou polímeros vêm sendo estudadas. Assim como o capítulo I, a redação do presente capítulo forneceu uma base importante para a execução e redação dos estudos de permeação/penetração cutânea dos capsaicinóides e das nanocápsulas poliméricas através da pele apresentados nos capítulos seguintes.

6. *CAPÍTULO III*

**COMBINED EFFECT OF POLYMERIC NANOCAPSULES AND CHITOSAN
HYDROGEL ON THE INCREASE OF CAPSAICINOIDS ADHESION TO THE
SKIN SURFACE**

Apresentação do Capítulo

O terceiro capítulo desta tese, intitulado em português “Efeito combinado de nanocápsulas poliméricas e hidrogel de quitosana no aumento da adesão dos capsaicinóides à superfície cutânea” está aceito para publicação na revista *Journal of Biomedical Nanotechnology* (vol. 10, pág. 820-830, 2014), da editora American Scientific Publishers. Este capítulo é o primeiro capítulo experimental desta tese. Neste trabalho foi avaliada o efeito do gel de quitosana e o efeito das nanocápsulas poliméricas na adesão cutânea dos capsaicinóides à superfície cutânea. Este trabalho deu seguimento aos experimentos realizados no mestrado acadêmico, durante o qual foi desenvolvido uma formulação cutânea inovadora que associa gel de quitosana e nanocápsulas poliméricas, a qual apresenta, em teoria, um grande potencial de adesão à pele devido às nanopartículas e à quitosana. Os experimentos foram realizados através da técnica de lavabilidade, utilizando células de Franz modificadas no compartimento doador, com uma entrada e uma saída para o líquido de lavagem (solução fisiológica). Após a realização dos experimentos, foi observado um grande tempo de permanência da formulação na pele, o que levou a uma maior quantidade de ativos (capsaicina e diidrocapsaicina) nas camadas viáveis da pele (epiderme e derme). Interessantemente, o efeito das nanocápsulas foi maior que o efeito da quitosana, que apresenta propriedades bioadesivas bem descritas. Sem haver a lavagem prévia da pele, a formulação inovadora controlou a penetração dos capsaicinóides até a derme, retendo estes na epiderme.

7. CAPÍTULO IV

**DECREASED IRRITATION OF CAPSAICINOIDS TO HUMAN SKIN BY MEANS
OF NANOENCAPSULATION**

Apresentação do Capítulo

O quarto capítulo desta tese, intitulado em português “Diminuição da irritação dos capsaicinóides à pele humana através da nanoencapsulação” está aceito para publicação na revista *International Journal of Nanomedicine*, da editora Dove Medical Press. Este capítulo é o segundo capítulo experimental desta tese. Neste trabalho foi avaliada, em humanos, a capacidade das nanocápsulas de diminuir a irritação cutânea dos capsaicinóides, fator que comumente leva ao abandono do tratamento da dor crônica. Foi também observada a tolerância da pele ao veículo inovador proposto, composto de quitosana e nanocápsulas poliméricas. Após a realização dos experimentos, foi observado que as nanocápsulas diminuem a irritação cutânea dos ativos, tanto observado pela medida do eritema (escala visual e sonda para determinação do eritema) quanto pela análise sensorial por parte dos voluntários. A nanoencapsulação diminui a permeação dos capsaicinóides através da epiderme humana, determinado com célula de Franz, porém não impede que esta ocorra, o que sugere que o efeito farmacológico será mantido. Com relação ao veículo proposto, capaz de carrear diversas substâncias lipofílicas (nas nanocápsulas) e/ou hidrofílicas (no gel) ele se apresentou como não irritante em humanos.

8. *CAPÍTULO V*



**STRUCTURAL ANALYSIS OF CHITOSAN HYDROGELS CONTAINING
POLYMERIC NANOCAPSULES**

Apresentação do Capítulo

O quinto capítulo desta tese, intitulado em português “Análise estrutural de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas” está pronto para submissão. Este capítulo, que é o terceiro capítulo experimental desta tese, avalia o efeito das nanocápsulas na estrutura do gel de quitosana, que apresenta interessantes propriedades como adesão e não irritabilidade cutânea, além da capacidade de diminuir a irritação e modular a permeação cutânea de ativos nanoencapsulados, mostradas nos capítulos anteriores. O estudo foi realizado através de diversas técnicas, como análise de tamanho, análise microscópica, reologia oscilatória, calorimetria exploratória diferencial e infravermelho, que permitiram propor a estrutura dos géis contendo, ou não, as nanocápsulas. Observou-se que as nanocápsulas estão em aglomerados nos géis, estes dificultando até certo grau as reticulações entre as cadeias de quitosana. No hidrogel contendo maior quantidade de nanopartículas, houve uma reorganização da estrutura tridimensional, levando à separação de fases nos microdomínios do gel.


9. *CAPÍTULO VI*

**DERMAL TOXICITY OF ACRYLIC-BASED CATIONIC NANOCAPSULES:
ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF OF THE SURFACE CHARGE AND THE
CHITOSAN GEL USED AS VEHICLE**

Apresentação do Capítulo

O sexto capítulo desta tese, intitulado em português “Toxicidade dérmica de nanocápsulas acrílicas catiônicas: Análise da influência da carga de superfície e de um gel de quitosana usado como veículo” está pronto para submissão. Este capítulo, que é o quarto capítulo experimental desta tese, foi desenvolvido durante o doutorado sanduíche no instituto de Farmacologia e Toxicologia da *Freie Universität Berlin*, Alemanha. Considerando a importância da nanotoxicologia atualmente, este trabalho avaliou o efeito das carga de superfície das nanocápsulas e o efeito do gel de quitosana usado como veículo na toxicidade dérmica das nanoformulações proposta neste trabalho, através dos estudos de penetração cutânea, de citotoxicidade e potencial irritante, todos *in vitro*. Após a realização dos experimentos, observou-se que as nanocápsulas catiônicas incorporadas em gel de quitosana, não penetram a pele intacta, apresentam toxicidade aos queratinócitos após 24h de contato, este provavelmente relacionado ao tensoativo da formulação, e não apresentam potencial irritante. A carga de superfície da partícula aumentou a interação destas com o estrato córneo na pele intacta, e aumentou a penetração as camadas viáveis, na pele lesada. Já o hidrogel de quitosana apresentou influência somente na penetração em pele lesada. A citotoxicidade não foi influenciada pela carga de superfície nem pela presença da quitosana.

10. *CAPÍTULO VII*



**APPLYING THE SENSORY ANALYSES IN THE DEVELOPMENT OF A
NOVEL CHITOSAN HYDROGEL CONTAINING POLYMERIC
NANOCAPSULES FOR CUTANEOUS USE**

Apresentação do Capítulo

O sétimo capítulo desta tese, intitulado em português “Aplicação da análise sensorial no desenvolvimento de um gel de quitosana inovador contendo nanoápsulas poliméricas para uso cutâneo” está pronto para submissão. Este capítulo, que é o quinto capítulo experimental desta tese, avaliou a aceitação cosmética da formulação inovadora, composta de quitosana e nanocápsulas, através de estudos de análise sensorial. A análise se dividiu em duas fases. Na primeira objetivou-se comparar a formulação de quitosana a um gel de hidroxietilcelulose, que é um hidrogel amplamente utilizado em formulações cosméticas e dermatológicas. Na segunda fase, após o gel de quitosana ser modificado com base nos atributos observados na fase 1, objetivou-se comparar o gel de quitosana modificado ao gel de quitosana prévio. A pegajosidade imediata e a formação do filme na pele foram considerados atributos a serem aprimorados no gel de quitosana, visando uma maior aceitação da formulação. Através da modificação com adjuvantes cosméticos (PCA-Na e silicone volátil) foi possível reduzir a percepção de filme formado na pele, de forma a aumentar a aceitação do veículo inovador proposto. As nanocápsulas, por sua vez, apresentaram pouca influência no sensorial do hidrogel.

**NANOENCAPSULATION OF ROSE-HIP OIL: TECHNOLOGICAL ASPECTS,
IN VITRO OXIDATION STUDY AND OBTAINMENT OF A FINAL
FORMULATION FOR CUTANEOUS USE**

Apresentação do Capítulo

O oitavo e último capítulo desta tese, intitulado em português “Nanoencapsulação de óleo de rosa mosqueta: Aspectos tecnológicos, estudo de oxidação *in vitro*, e obtenção de uma formulação final para uso cutâneo” está pronto para submissão. Este capítulo, que é o sexto e último capítulo experimental desta tese, buscou uma nova aplicação para o hidrogel de quitosana. Tendo em vista as propriedades de regeneração cutânea do biopolímero, foi proposta uma formulação composta de hidrogel de quitosana e nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta. Avaliou-se primeiramente, através de um estudo fatorial, a influência da quantidade de acetona, de polímero e de óleo de rosa mosqueta nas propriedades das nanocápsulas (tamanho de partícula, homogeneidade de tamanho e porcentagem de partículas micrométricas). Observou-se que a quantidade de acetona e a quantidade de óleo são capazes de alterar os parâmetros, de forma que foi possível obter uma suspensão nanoestruturada final com propriedades adequadas que também apresentaram uma propriedade de proteção do óleo vegetal contra a degradação frente à radiação ultravioleta. A suspensão de nanocápsulas foi incorporada no gel, juntamente com os adjuvantes cosméticos determinados no capítulo VII. A formulação foi caracterizada e apresentou capacidade de carrear adequadamente as nanopartículas, sem causar dano ou sem levar à instabilidade física destas.

12. *DISCUSSÃO GERAL*



Neste trabalho foram estudadas as propriedades cutâneas dos hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, tendo em vista as características interessantes e promissoras dos sistemas nanométricos e do biopolímero quitosana. O estudo desta formulação promissora iniciou no mestrado acadêmico em 2009, com estudos de propriedades físico-químicas e estudo de liberação dos ativos nanoencapsulados (capsaicinóides). Os estudos da presente tese de doutorado incluíram análise da influência das nanocápsulas na permeação e irritação cutânea dos capsaicinóides, análise da bioadesividade da formulação, análise da estrutura do hidrogel, análise de nanotoxicidade (permeação cutânea e citotoxicidade das nanopartículas em suspensão aquosa e em gel) além da análise do potencial irritante para a pele e mucosa. Além destes, também foi realizado um estudo dedicado à obtenção de uma formulação, com propriedades cicatrizantes, a base de quitosana e nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta. Conforme mencionado, foram estudados dois ativos diferentes, encapsulando-os às nanocápsulas e, posteriormente, incorporando as referidas nanocápsulas nos hidrogéis de quitosana. Os três primeiros artigos (correspondentes ao terceiro, quarto e quinto capítulos desta tese) referem-se aos estudos com capsaicinóides nanoencapsulados, enquanto o oitavo capítulo ao estudo referente à nanoencapsulação do óleo de rosa mosqueta. Além disso, dois capítulos (VI e VII) se basearam em experimentos com nanocápsulas brancas (sem a presença de ativos).

Primeiramente foram realizados experimentos com os capsaicinóides (representados pela capsaicina e pela diidrocapsaicina) que são as substâncias responsáveis pelo sabor picante das pimentas *capsicum* (HAYMAN & KAM, 2008). Os capsaicinóides apresentam atividade analgésica tópica, porém causam intensa irritação cutânea quando são administrados à pele, e, além disso, sucessivas aplicações são necessárias para o efeito farmacológico (BARCELOUX, 2008; KNOTKOVA *et al.*, 2008). Portanto, a sua nanoencapsulação é justificada e é promissora, pois a liberação controlada dos ativos pode diminuir a irritação e o número de aplicações necessárias. A nanoencapsulação dos capsaicinóides, juntamente com o estudo de liberação, a partir das nanocápsulas em gel de quitosana (CONTRI *et al.*, 2010) ou em suspensão aquosa (CONTRI *et al.*, 2011), já foram previamente realizados

durante o mestrado. Estes estudos permitiram a promoção antecipada para o doutorado, sendo o ponto de partida para a presente tese.

O óleo de rosa mosqueta, o outro ativo selecionado, apresenta potencial para regeneração cutânea (PAREJA e KEHL, 1990; EURIDES *et al.*, 2001) e a sua nanoencapsulação pode prolongar o efeito por controlar a liberação (CONTRI *et al.*, 2011), além de proteger o óleo contra degradação e facilitar sua incorporação em veículos hidrofílicos. Em ambos os casos, o gel de quitosana, devido ao seu caráter bioadesivo e formador de filme (RINAUDO, 2006), pode garantir um contato íntimo e por tempo prolongado das partículas com a pele, modulando a permeação cutânea dos ativos, além de apresentar um potencial cicatrizante e bacteriostático (UENO, *et al.*, 1999, UENO *et al.*, 2001) que se somam às propriedades cicatrizantes do óleo de rosa mosqueta. A nanoencapsulação do óleo vegetal em questão foi previamente realizada, durante o mestrado acadêmico e recentemente foi publicado (CONTRI *et al.*, 2013).

No primeiro trabalho experimental (capítulo III) foram estudadas as propriedades bioadesivas tanto das nanocápsulas poliméricas quanto do hidrogel de quitosana, e também a influência destes veículos na permeação dos capsaicinóides nanoencapsulados. Para tanto foram obtidas nanocápsulas contendo capsaicinóides na concentração de 3mg.mL^{-1} . Esta concentração é maior do que a utilizada durante os estudos prévios (mestrado acadêmico), que foi de 0,5%. Este ajuste foi necessário para que fosse possível quantificar os ativos nas amostras de lavagem da pele, através do método analítico previamente determinado e validado. Foram comparadas três formulações: gel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados, gel de quitosana contendo fármaco na forma livre (solução micelar, na mesma concentração de ativo), para testar o efeito das nanocápsulas, e gel de hidroxietilcelulose contendo capsaicinóides nanoencapsulados, para testar o efeito do gel na adesão cutânea da formulação. Como membrana utilizou-se pele de porco contendo epiderme e derme, que foi colocada em célula de Franz manual modificada no seu compartimento doador, para permitir o experimento de lavagem da superfície da pele. Observou-se através deste trabalho que ambos os fatores (nanocápsulas poliméricas e hidrogel de quitosana) se somam, conferindo à formulação inovadora maior capacidade de adesão cutânea.

Interessantemente, o efeito das nanocápsulas se apresentou maior do que o efeito da quitosana. Devido ao fato de manter os capsaicinóides por mais tempo em contato com a pele, a formulação à base de quitosana e de nanocápsulas levou a uma maior quantidade de ativos nas camadas viáveis da pele (epiderme e derme), o que é preferível visando a dessensibilização dos nervos periféricos para ação dos capsaicinóides. Por outro lado, quando não foi realizada lavagem da pele, as nanocápsulas levaram a uma maior quantidade de ativos na epiderme, enquanto o gel contendo ativos na forma livre levou a uma maior quantidade na derme. Este resultado é explicado pela propriedade de reservatório das nanocápsulas, controlando a liberação de ativos lipofílicos e, conseqüentemente, modulando sua permeação.

No segundo trabalho experimental (capítulo IV), ainda visando avaliar as propriedades cutâneas dos hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados, estudou-se o efeito da nanoencapsulação dos ativos sobre a irritação cutânea destes, estudando-se, simultaneamente, a tolerância cutânea ao veículo inovador proposto (gel de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas brancas). Foi realizado um estudo em humanos ($n=13$, projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFRGS) para avaliar a irritação cutânea causada pelos capsaicinóides utilizando uma sonda que mede o eritema na pele e empregando uma escala visual de eritema, além da análise sensorial por parte dos voluntários. A formulação teste foi comparada a dois controles contendo fármaco na forma não-nanoencapsulada (formulação comercial e hidrogel de quitosana contendo fármaco em solução hidroalcoólica). Para permitir a comparação com a formulação comercial de capsaicinóides, foram utilizadas nanocápsulas contendo $0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ativos. O gel contendo ativo na forma livre foi obtido com solução hidroalcoólica de ativos, ao invés de solução micelar, como observado no capítulo anterior, para chegar a uma condição de total ausência de controle da liberação, uma vez que foi observado previamente que a solução micelar apresenta certa capacidade de controlar a liberação dos ativos. Ambas as formulações contendo fármaco na forma livre causaram irritação medida pela sonda e determinada pela análise visual, enquanto a formulação nanoestruturada não causou. Os voluntários sentiram irritação moderada e severa nos locais do braço onde foram aplicadas as formulações comercial e de solução hidroalcoólica. Um estudo de permeação cutânea foi

realizado neste trabalho, desta vez com membrana de epiderme humana e célula de Franz padrão e automática. É importante ressaltar que, já que os capsaicinóides foram obtidos como uma mistura, não era possível fazer a separação destes durante a obtenção das nanocápsulas. Sendo assim, a capsaicina e a dihidrocapsaicina foram quantificados separadamente no fluido receptor (etanol 30% em água) porém foi obtida a soma para cada ponto de coleta, para que a formulação proposta pudesse ser comparado ao comercial que apresentava o mesmo teor de capsaicina+dihidrocapsaicina, mas não o mesmo teor de cada ativo de forma isolada. Observou-se uma diminuição da quantidade permeada e no fluxo de capsaicinóides através da epiderme, devido a nanoencapsulação destes, o que está de acordo com o estudo de permeação cutânea realizada no capítulo III. Porém, a nanoencapsulação não impediu, como já esperado devido aos estudos de liberação, que o fármaco fosse liberado e permeasse através da barreira cutânea, indicando que haveria efeito farmacológico. Mais uma vez, o efeito reservatório das nanocápsulas modulou a permeação/penetração cutânea, por controlar a liberação, desta vez evitando causar irritação. Além disto, foi provado através deste trabalho que o veículo inovador proposto, composto de quitosana e nanocápsulas não causa irritação cutânea. Este veículo poderia ser utilizado tanto em formulações dermatológicas quanto cosméticas, carreando ativos lipofílicos nas nanocápsulas, ativos hidrofílicos no gel, ou ambos.

Dando sequência, objetivou-se no terceiro trabalho experimental (capítulo V), que tem perfil mais físico-químico que os demais, estudar a estrutura dos hidrogéis de quitosana, uma vez que se sabia previamente (CONTRI *et al.*, 2010) que as nanocápsulas levavam a um leve aumento na consistência dos géis, o que pode ser devido a algum efeito destas na cadeia do hidrogel de quitosana. Levou-se em conta que uma formulação que apresenta propriedades cutâneas interessantes deve ter a sua estrutura tridimensional bem determinada. Foram obtidos diferentes géis de quitosana, cada um contendo uma porcentagem de suspensão de nanocápsulas diferente, adicionada durante a obtenção do gel (Gel A= 0% suspensão de NC; Gel B = 30% de suspensão de NC; Gel C= 50% de suspensão de NC, Gel D= 100% de suspensão de NC). A suspensão de nanocápsulas utilizada continha capsaicinóides ($0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Utilizando diversas técnicas de caracterização (difração de laser, reologia

oscilatória, difratometria exploratória diferencial, infravermelho, microscopia eletrônica de varredura) sugeriu-se que as nanocápsulas estariam em aglomerados nos hidrogéis de quitosana. Estes aglomerados parecem ser rapidamente redispersos até o tamanho nanométrico quando em meio aquoso. Devido à formação dos aglomerados, há uma provável perda de interação entre as cadeias de quitosana, até chegar a uma concentração limite onde há separação de fases nos microdomínios do gel. Apesar disso, o gel de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas apresentou uma rede de hidrogel bem desenvolvida e não apresentou separação de fases na escala macro. Este resultado apontou que, entre os hidrogéis obtidos, o gel D, apesar da separação de fases nos microdomínios, poderia ser a formulação de escolha para incorporação de ativos cosméticos e dermatológicos, uma vez que a quantidade de ativo nanoencapsulado incorporado ao gel será maior e, nesta concentração de nanocápsulas, não parece haver influência das nanocápsulas na reticulação das cadeias da quitosana.

Observando-se as grandes potencialidades cutâneas do hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, o quarto e o quinto trabalhos experimentais (capítulo VI e VII) visaram estudar aspectos de toxicidade e de sensorial da formulação, considerando a crescente preocupação com relação à nanotoxicologia (ciência que visa determinar a segurança de nanomateriais e nanopartículas) e a importância da análise sensorial como uma ferramenta do desenvolvimento farmacotécnico de produtos para uso cutâneo.

Os estudos de nanotoxicidade foram realizados durante o doutorado sanduíche em 2012, no instituto de farmacologia e toxicologia da *Freie Universität Berlin* (Alemanha) sob a supervisão da professora Dr. Monika Schäfer-Korting. As amostras testadas foram: (i) suspensão de nanocápsulas catiônicas, obtidas com o polímero catiônico EudragitRS100[®], como vinha sendo feito até então neste trabalho, (ii) suspensão de nanocápsulas aniônicas, obtidas com o polímero Eudragit S100[®], para testar o efeito da carga de superfície das nanocápsulas na toxicidade da formulação e (iii) gel de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas, para testar o efeito do gel de quitosana na toxicidade da formulação. Foram obtidas nanocápsulas com óleo fluorescente no núcleo, sintetizado em colaboração com a professora Adriana R. Pohlmann do instituto de Química da UFRGS, para a determinação da penetração cutânea das

partículas (pele humana dermatomizada contendo 1mm de espessura) e da captação celular destas (queratinócitos e fibroblastos primários na terceira passagem) utilizando microscópio de fluorescência. Para os demais experimentos [citotoxicidade (queratinócitos e fibroblastos primários na terceira passagem, avaliação por MTT e Vermelho Neutro) e potencial irritante *in vitro* (HET-CAM, utilizando membrana corioalantóide de ovos embrionados) foram realizados com formulações brancas, não fluorescentes. Observou-se que as nanocápsulas só conseguem entrar em contato com as camadas viáveis (epiderme e derme) se houver rompimento da barreira cutânea (*tape stripping* realizado através da colagem e retirada de 30 fitas à superfície da pele). Quando em contato com a pele intacta, as nanocápsulas ficam retidas no estrato córneo, de forma que a carga catiônica das partículas influenciou nesta retenção. Quando a pele foi lesada, tanto a carga catiônica quanto a presença do gel de quitosana influenciaram na penetração, aumentando a intensidade de fluorescência detectada nas camadas da pele. O gel de quitosana, provavelmente devido a sua capacidade de atuar sobre as junções entre as células (*tight junctions*), aumentou a penetração das nanocápsulas. Já a carga catiônica das nanocápsulas possivelmente aumentou a adesão à pele, levando a uma maior penetração das nanoestruturas. Uma vez observado que as nanocápsulas podem entrar em contato com as células viáveis quando a pele se encontra lesada, seguiu-se com o experimento de citotoxicidade. Somente foi observada toxicidade em queratinócitos, e após tempos de contato de 24 h e 48 h. A presença do tensoativo polissorbato 80 parece ser o responsável pela toxicidade observada, devido a sua capacidade de extrair lipídios da membrana e aumentar a permeabilidade celular. Observou-se que houve captação de nanocápsulas por parte tanto dos queratinócitos quanto dos fibroblastos, de forma a haver mais captação com o passar do tempo de contato (30 min até 4h). Através do estudo HET-CAM, não foram observados efeitos como lise, hemorragia ou coagulação dos vasos sanguíneos após aplicação das formulações, de forma a classificar estas como não-irritantes, o que está de acordo com os resultados obtidos no estudo de irritação cutânea realizado em humanos no capítulo IV. Os estudos em membrana corioalantóide indicam, principalmente, o potencial irritante em mucosa ocular, devido a semelhança desta membrana com a mucosa em questão. Para a análise de produtos

cosméticos e dermatológicos, é de extrema importância a determinação da irritação ocular, e não somente de irritação cutânea. De forma geral, a formulação apresentou penetração cutânea restrita a uma condição de pele lesada, baixo potencial citotóxico em células do tecido cutâneo e não apresentou potencial irritante.

O estudo de análise sensorial da formulação composta de gel de quitosana e nanocápsulas poliméricas (brancas, sem ativo) foi do tipo discriminativo e afetivo e foi dividido em duas fases que contaram com 60 voluntários não treinados em cada fase. O projeto teve prévia aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da UFRGS. Na primeira fase comparou-se o gel de quitosana a um gel de hidroxietilcelulose (ambos com e sem nanocápsulas). Observou-se, nesta primeira etapa, que o hidrogel de quitosana, independentemente da presença das nanocápsulas, apresentou maior pegajosidade imediata e maior formação de filme na pele em comparação aos hidrogéis de hidroxietilcelulose correspondente. Estas propriedades levaram provavelmente à menor preferência observada para os géis de quitosana. Portanto, para a segunda etapa da análise sensorial, os hidrogéis de quitosana foram modificados através da utilização de adjuvantes cosméticos (silicone volátil e sal sódico do ácido pirrolidona carboxílico - PCANa) na formulação. O silicone volátil confere menor pegajosidade às formulações enquanto que o PCANa aumenta a hidratação cutânea o que poderia levar a um menor filme de quitosana observado na pele. Para a escolha destes adjuvantes, foram feitos diversos testes prévios. Após a modificação do gel de quitosana, iniciou-se a fase 2, que comparou o gel de quitosana prévio, com o gel de quitosana modificado (ambos com e sem nanocápsulas). Observou-se uma maior preferência do gel modificado e bem como uma diminuição da percepção do filme formado na pele. A presença das nanocápsulas no sensorial do hidrogel de quitosana também foi determinada em cada fase. No caso dos hidrogéis de quitosana não modificados, as nanocápsulas levaram a uma maior percepção do filme formado na pele, devido à maior consistência do hidrogel ou à opacidade da formulação, enquanto que no caso dos hidrogéis modificados, levou apenas à percepção de um filme mais homogêneo. A análise sensorial é uma análise essencial para determinar a aceitação cosmética da formulação e os pontos a

serem aprimorados, representados pela formação de filme na pele e pela pegajosidade imediata no caso do hidrogel de quitosana.

O sexto e último trabalho (capítulo VIII) apresentou como proposta encapsular um ativo cujas propriedades cicatrizantes se somam às propriedades da quitosana de promoção de cicatrização, efeito bacteriostático, e bioadesão, entre outras, desenvolvendo um hidrogel com capacidade regeneradora da pele. Primeiramente, desenvolveu-se um fatorial para o desenvolvimento de uma suspensão de nanocápsulas contendo o ativo em questão apresentando propriedades adequadas em termos de diâmetro de partícula e homogeneidade de tamanho. Alterou-se a concentração de polímero, óleo e acetona, todos adicionados à fase orgânica no momento da obtenção das nanoestruturas. A formulação base do sensorial foi uma suspensão aquosa contendo o dobro das quantidades padrões (como utilizado nos outros capítulos), para permitir a obtenção de uma formulação com mais óleo de rosa mosqueta, visando um maior efeito. Com relação a essa formulação base, aumentando a quantidade de acetona e reduzindo a quantidade de óleo foi possível obter os melhores resultados. A formulação selecionada apresentou características físico-químicas adequadas, além de possuir capacidade de proteger o óleo vegetal contra degradação devido à radiação ultravioleta A e C, determinado por um estudo *in vitro* de peroxidação lipídica. A oxidação é um problema comum da utilização de óleos de origem vegetal. Após otimizar a suspensão de nanocápsulas, obteve-se um hidrogel de quitosana incorporando as nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta. Foi também adicionado neste hidrogel os adjuvantes cosméticos determinados no capítulo anterior. A formulação se apresentou como uma proposta adequada, com partículas nanométricas e com menos tendência à cremagem, em comparação às nanocápsulas mantidas em suspensão aquosa.

Os dois primeiros capítulos desta tese, que correspondem a capítulos de livros (publicado e aceito para publicação), foram de grande importância para a realização e discussão de todo o trabalho, principalmente para os estudos de permeação/penetração cutânea realizados nos capítulos III, IV e VI. Além de estudos relacionados à permeação/penetração cutânea, o presente trabalho de doutorado contou com experimentos diferenciados em cada capítulo, visando uma boa abrangência dos estudos que são possíveis quando o foco é a via cutânea de aplicação de substâncias ativas.

Através do presente trabalho, foram provadas propriedades cutâneas importantes das nanocápsulas poliméricas como a grande adesão cutânea, a diminuição da irritação cutânea causada pelos capsaicinóides e a capacidade de modular a permeação destes, a baixa toxicidade cutânea, a retenção das nanocápsulas no estrato córneo, e a capacidade de proteção do núcleo oleoso (representado neste trabalho pelo óleo de rosa mosqueta) frente à degradação por radiação ultravioleta. Além disso, o hidrogel de quitosana proposto para carrear as nanocápsulas poliméricas se apresentou como uma estrutura de rede de hidrogel bem formada e uma alternativa promissora para aplicação cutânea. A formulação conjugou as seguintes propriedades: é não-irritante e não-citotóxica, apresenta uma grande adesão cutânea, propriedades sensoriais adequadas e capacidade de estabilizar fisicamente as nanopartículas após a incorporação no gel.

14. REFERÊNCIAS



AHUMADA, D.A.F. Diagnóstico de mercado del aceite de rosa mosqueta y sus posibilidades de desarrollo. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal, Santiago, 2005.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28, p.165-72, 2009.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIKA, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, M. P. *Formas farmacêuticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro*. Porto Alegre, 2006. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.341, p.215-220, 2007.

ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 258 , p.151–165, 2012.

BARCELOUX D. G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 1157p.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62 , p. 83-99, 2010.

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

^bBERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.

BUZEA, C.; BLANDINO, I.I.P.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, v. 2, p. pages MR17 - MR172, 2007.

- CASTRO, G.A.; COELHO, A.L.L.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAHECHAB, G.A.B.; ORÉFICEC, R.L. FERREIRA, L.A. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 381 p.77–83, 2009.
- CHEN, S-C.; WUA, Y-C.; MIB, F-L.; LINA, Y-H.; YUA, L-C.; SUNG, H-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.96, p.285- 300, 2004.
- CHENITE, A.; BUSCHMANN, M.; WANG, D.; CHAPUT, C.; KANDANI, N. Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerolphosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, v.46, p.39-47, 2001.
- CONTRI, R. V. ; KATZER, T. ; POHLMANN, A.R. ; GUTERRES, S. S. . Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery. *Soft Materials*, v. 8, p. 370-385, 2010.
- CONTRI, R. V. ; KAISER, M. ; POLETTO, F. S. ; POHLMANN, A.R. ; GUTERRES, S. S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 2398-2406, 2011.
- CONTRI, R. V. ; CORREA, K. L. F. ; FIEL, L.A. ; POHLMANN, A.R. ; GUTERRES, S. S. . Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, v. 8, p.913-924, 2013.
- DWECK, A.C. Formulating with natural ingredients. *Cosmetics & Toiletries*, v.116, p.57-60, 2001.
- EURIDES, D.; DA SILVA, L.A.F.; DALECK, C.R.; FREITAS, P.M.C.; ALVES, L.B. Efecto del extracto de óleo de rosa mosqueda (*Rosa aff. Rubiginosa*) en la cicatrización de heridas cutáneas. *Revista Electrónica de Veterinaria*, v.12, 2011.
- ERIN, N.; ZIK, B.; SARIGÜL, M.; TÜTÜNCÜ. S. The effects of chronic low-dose capsaicin treatment on substance P levels. *Regulatory Peptides*, v.153, p.83-87, 2008.
- FONTANA, M. C. ; CORADINI, K. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; BECK, R. C. R. . Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 3091-3099, 2010.
- FRANCO, D.; PINELO, M.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Processing of *Rosa rubiginosa*: Extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresource Technology*, v.98, p.3506–3512, 2007.

- 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.
- HAN, H.D.; SONG, X.K.; PARK, Y.S.; NOH, K.H.; KIM, J.H.; HWANG, T.; KIM, T.W.; CHIN, B.C. A chitosan hydrogel based cancer drug delivery system exhibits synergistic antitumor by combining with a vaccinia viral vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, p.27-34, 2007.
- HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v.19, p.338-343, 2008.
- HIN, T.S. Engineering Materials for Biomedical Applications. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2004. 352p.
- JÄGER, 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, p. 297-305, 2007.
- JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S.V.; TAMUR, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 227–232, 2010.
- JONES, C.F.; GRAINGER, D.W. In vitro assessments or nanomaterial toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, v. 61, p. 438-456, 2009.
- KEMPE, S.; METZ, H.; BASTROP, M.; HVILSOM, A.; CONTRI, R.V.; MÄDER, K. Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.68, p.26-33, 2008.
- KNOTKOVA, H.; PAPPAGALLO, M.; SZALLASI, A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief- Farewell or revival? *Clinical Journal of Pain*, v.24, p.142-154, 2008.
- KÜLKAMP, I.C.; PAESE, K.; POHLMANN, A., GUTERRES SS. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Química nova*, v.8, p. 2078-2084, 2009.
- KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C.; BERLITZ, S.J.; CONTRI, R.V.; ALVES, L.R.; HENRIQUE, E.G.; BARREIROS, V.R.M.; GUTERRES, S.S. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *International Journal of Cosmetic Science*, v.35, p. 105-111, 2013.
- LAKSHIMI, P.K.; DEVI, G.S.; BHASKARAN, S.; SACCHIDANAND, S. Niosomal mathotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: phase I and phase II studies. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, v.3, p.157-161, 2007.

- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J-F. ; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*, v.82, p. 319-334, 2002.
- LIN, C-C. ; METTERS, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1379-1408, 2006.
- LIONZO, M.I.Z. ; LORENZINI. G. C. ; SILVEIRA, N. P. . Effect of Nanoparticles on the viscosity of a biopolymer gel. Em: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia, 2010, Porto Alegre. Anais, 2010. v. 1.
- MARTINEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v.64, p.586-595, 2007.
- MI, F-L.; KUAN, C-Y.; SHIU, S-S.; LEE, S-T.; CHANG, S-F. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of chitosan glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers*, v.41, p.389-396, 2000.
- MOHAMMED, A. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology* , v. 43, p. 837-842, 2010.
- NGAH, W.S.W.; TEONGA, L.C.; HANAFIAH, M.A.K.M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 83 p. 1446-1456, 2011.
- NOHYNEK, G.J.; DUFOUR, E.K.; ROBERTS, M.S. Nanotechnology, cosmetics and the skin: Is there a health risk? *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 21, p. 136-149, 2008.
- OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 1-4, 2008.
- ORTEGA, G.G.; NETZ, P.A. Fundamentos de Físico-Química, Uma abordagem conceitual para as ciencias farmacêuticas. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 299p.
- PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.5, p.1-7, 2009.

- PAREJA, B; KEHL, H. Contribución a la identificación de los principios activos en el aceite de *Rosa aff. Rubiginosa*. L. *An. Real. Acad. Farm*, v.56, p.283-294, 1990.
- POPLE, P.V.; SINGH, K.K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. *International Journal of Pharmaceutics*, v.398, p.165-178, 2010.
- PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H.P.; ROBERTS, M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p.470-491, 2011.
- RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, n.1, p.1-27, 2000.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v.31, p.603-632, 2006.
- RUEL-GARIÉPY, E.; LECLAIRB, G.; HILDGENB, P.; GUPTAC, A.; LEROUX, J-C.; Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *Journal of Controlled Release*, v.82, p.373-383, 2002.
- RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J-C. In situ forming hydrogels - review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.409-426, 2004.
- SANTOS, J.S. dos; VIEIRA, A.B.D.; KAMADA, I. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 62, p. 457-62, 2009.
- 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, p.726-737, 2003.
- SCHNEIDER, M.; STRACKE, F.; HANSEN, S.; SCHAEFER, U.F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-Endocrinology*, v. 1, p. 197-206.
- SHAH, K.A.; DATE, A.A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v.345, p.163-171, 2007.
- SILVA, A.L.M. da; CONTRI, R.V.; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. *Skin Research and Technology*, v. 19, p. e223–e230, 2013.

- SIQUEIRA, N. M. ; CONTRI, R. V. ; PAESE, K. ; BECK, 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, p. 166-174, 2011.
- 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 in hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.83-90, 2004.
- TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D, S.; POHLMANN, A, R.; GUTERRES S.S. Development of semisolid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. *Latin America Journal of Pharmacy*, v.28, p.819-826, 2009.
- UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *Biomaterials*, v. 20, p. 1407-1414, 1999.
- UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, p.105-115, 2001.
- VALENTA, C.; CHRISTEN, B.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Chitosan-EDTA: a novel polymer for topical gels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.54, p.1453-1459, 2002.
- VALENTA, C.; AUNER, B. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.279-289, 2004.
- VÅRUM, K.M.; SMIDSRØD, O. Structure-Property Relationship in Chitosans. In: DUMITRIU, S., Polysaccharides: structural diversity and functional versatility, 2. ed., New York: Dekker, 2005. p. 625-642.
- VEGA-VILLA, K.R.; TAKEMOTO, J.K.; YÁÑEZ, J.A.; REMSBERG, C.M.; FORREST, M.L.; DAVIES, N.M. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 929–938, 2008.
- VENTURINI, C. G., BRUINSMANN, F. A., RAFFIN, R. P., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S. S. Development of imiquimod-loaded lipid-core nanocapsules for topical administration. FBPOL-3rd French Brazilian Meeting on Polymers, Florianópolis, 2011.
- WANG, J.C.; CHEN, S.H.; XU, Z.C. Synthesis and properties research on the nanoencapsulated capsaicin by simple coacervation method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v.29, p.687-695, 2008.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F.; ZANCAN, L.R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 4, p. 80-89, 2008.

WU, J. ; WEI, W. ; WANG, L-Y.; SU, G-S.; MA, G-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials*, v.28, p.2220-2232, 2007.

XING, F.; CHENG, G.; YI, K.; MA, L. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, v.96, p.2225-2229, 2005.

ZI, P.; YANG, X.; KUANG H.; YANG, Y.; YU, L. Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v.358, p.151-158, 2008.

Graduação:

- Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), finalizado em 2007.
- Farmácia Industrial (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), a ser finalizado em 2014.

Pós-Graduação:

- Mestrado em Ciências Farmacêuticas (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), finalizado em 2009.
- Doutorado em Ciências Farmacêuticas (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com período na *Freie Universität Berlin*, Alemanha), finalizado em 2013.

Docência:

- Professora substituta das disciplinas de Operações Unitárias, Processos Industriais e Equipamentos e Introdução às Ciências Farmacêuticas (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) desde Agosto 2013.

Artigos Científicos:

- **CONTRI, R.V.**; FRANK, L.A.; KAISER, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Decreased irritation of capsaicinoids to human skin by means of nanoencapsulation. *International Journal of Nanomedicine*, accepted in 2013.
- BRUM, T.L.; FIEL, L.A.; **CONTRI, R.V.**; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, accepted in 2013.
- **CONTRI, R.V.**; KATZER, T.; OURIQUE, A.F.; SILVA, A.L.M. da; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of

- capsaicinoids adhesion to the skin surface. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 10, p. 820-830, 2014.
- **CONTRI, R.V.**; CORRÊA, K.L.R.; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, v. 8, p.913-924, 2013.
 - KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C.; BERLITZ, S.J.; **CONTRI, R.V.**; ALVES, L.R. ; HENRIQUE, E.G.; BARREIROS, V.R.M.; GUTERRES, S.S. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 35, p. 105-111, 2013.
 - SILVA, A.L.M. da; **CONTRI, R.V.**; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R. GUTERRES, S.S. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. *Skin Research and Technology*, v. 19, p. e223–e230, 2013.
 - OURIQUE, A.F.; **CONTRI, R.V.**; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; MELERO, A.; SCHAEFER, U.F. BECK, R.C.R. Set-up of a method using LC-UV to assay mometasone furoate in pharmaceutical dosage forms. *Química Nova*, v. 35, p. 818-821, 2012.
 - KULKAMP-GUERREIRO, I.C.; TERROSO, T.F.; ASSUMPÇÃO, E.R.; BERLITZ, S.J.; **CONTRI, R.V.**; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Development and Stability of Innovative Semisolid Formulations Containing Nanoencapsulated Lipoic Acid for Topical Use. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 12, p. 7723-7732, 2012.
 - **CONTRI, R.V.**; KAISER, M.; POLETTO, F.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 2398-2406, 2011.
 - 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, p. 166-174, 2011.

- **CONTRI, R.V.**; KATZER, T.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan Hydrogel Containing Capsaicinoids-Loaded Nanocapsules: An Innovative Formulation for Topical Delivery. *Soft Materials*, v. 8, p. 370-385, 2010.
- STRÜBING, S.; ABOUD, T.; **CONTRI, R.V.**; METZ, H.; MÄDER, K. New insights on poly(vinyl acetate)-based coated floating tablets: Characterisation of hydration and CO₂ generation by benchtop MRI and its relation to drug release and floating strength. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 708-717, 2008.
- KEMPE, S.; METZ, H.; BASTROP, M.; HVILSOM, A.; **CONTRI, R.V.**; MÄDER, K. Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 26-33, 2008.
- **CONTRI, R.V.**; SIQUEIRA, N.M.; GUTERRES, S.S. Hidrogéis de quitosana: Estrutura e aplicações tópicas. *Allured's Cosmetics & Toiletries*, v. 20, p. 62-74, 2008.

Capítulos de livro:

- **CONTRI, R.V.**; KATZER, POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. *Drug transport across the skin*. In: Muro, S. (Org.), Drug delivery across physiological barriers. Maryland: Pan Stanford Publishing accepted in 2013.
- **CONTRI, R.V.**; GUTERRES, S.S. *A fotoproteção da pele*. In: Schenkel, E.P.; Mengue, S.S.; Petrovick, P.R. (Org.). Cuidados com os Medicamentos. 5ed. Florianópolis: Editora UFSC, p. 207-214, 2012.
- **CONTRI, R. V.** ; FIEL, L.A. ; POHLMANN, A.R. ; GUTERRES, S. 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.C.R; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.. (Org.). Nanocosmetics and nanomedicines: New approaches for skin care. Berlin: Springer, v. 1, p. 3-36, 2011.

ANEXO I

Aprovação no comitê de ética (Capítulos IV e VII)

**U F R G S**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA****Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs****CARTA DE APROVAÇÃO****Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:****Número:** 21520**Título:**

Avaliação do sensorial e da irritação cutânea de hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas

Pesquisadores:**Equipe UFRGS:**

SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - coordenador desde 01/08/2011

RENATA VIDOR CONTRI - pesquisador desde 01/08/2011

LUIZA ABRAHÃO - pesquisador desde 01/08/2011

IRENE CLEMES KULKAMP - pesquisador desde 01/08/2011

KATHERINE KRIESER - pesquisador desde 01/08/2011

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 01/12/2011 - Sala 01 de reuniões do Gabinete do Reitor, 6º andar do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 14 de Dezembro de 2011


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

ANEXO II

Fichas utilizadas na análise sensorial e na irritação cutânea (Capítulo IV e VII)

Nome: _____ Data: _____
CÓDIGO AMOSTRAS: _____ E _____

ANÁLISE SENSORIAL DISCRIMINATIVA

Espalhabilidade

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo ESPALHABILIDADE?

Não ()

Sim () Qual amostra espalha mais na pele? _____

Oleosidade

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo OLEOSIDADE?

Não ()

Sim () Qual amostra é mais oleosa ao aplicar na pele? _____

Pegajosidade

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo PEGAJOSIDADE?

Não ()

Sim () Qual amostra é mais pegajosa ao aplicar na pele? _____

Avaliar após 15 minutos da aplicação:

Formação de Filme

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo FORMAÇÃO DE FILME?

Não ()

Sim () Qual amostra tem formação de maior quantidade de filme na pele? _____

Qualidade do Filme

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo QUALIDADE DO FILME FORMADO?

Não ()

Sim () Qual amostra forma filme mais homogêneo na pele? _____

Pegajosidade Residual

Na sua opinião, as amostras apresentam diferença no atributo PEGAJOSIDADE RESIDUAL?

Não ()

Sim () Qual amostra apresenta mais pegajosidade residual na pele? _____

ANÁLISE SENSORIAL AFETIVA

Qual sua amostra preferida ao aplicar na pele? _____

TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA – FICHA DO AVALIADOR**Voluntário:****Data:****Hora da aplicação:**

Escala: 0-ausência de eritema / 1-eritema muito fraco (alguns pontos vermelhos) / 2-eritema fraco (os pontos um pouco mais definidos) / 3-eritema moderado (não apenas pontos, vermelhidão) / 4-eritema forte (vermelhidão homogênea ocupando todo o círculo onde está a formulação) / 5-eritema extremo (vermelhidão ocupando mais do que o círculo da formulação).

Posição de aplicação	Tempo (min)	0	1	2	3	4	5
A	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						
B	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						
C	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						
D	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						
E	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						
F	0						
	30						
	60						
	90						
	120						
	180						


TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA – FICHA DO VOLUNTÁRIO**Voluntário:****Data:****Hora da aplicação:**

Atribua valores para sensações características de irritação (ardência, coceira, queimação) que você está sentindo. Utilize a seguinte escala:

0-não sinto / 1- sinto levemente / 2- sinto consideravelmente / 3- sinto fortemente

Posição de aplicação da amostra	Tempo (min)	Atribuição para irritação
A	30	
	60	
	90	
	120	
	180	
B	30	
	60	
	90	
	120	
	180	
C	30	
	60	
	90	
	120	
	180	
D	30	
	60	
	90	
	120	
	180	
E	30	
	60	
	90	
	120	
	180	
F	30	
	60	
	90	
	120	
	180	

ANEXO III



Fotos dos experimentos (Capítulos III, IV, VI e VII)

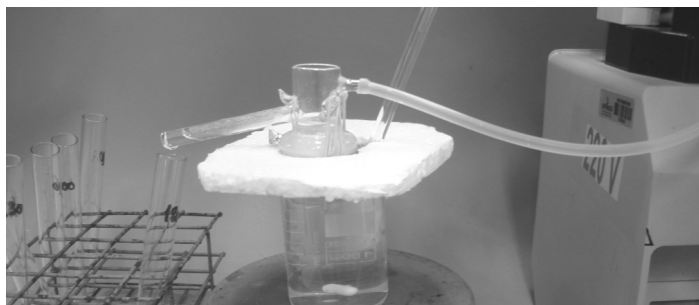


Figura 1 – Capítulo III. Célula de Franz modificada para experimento de lavabilidade e permeação/penetração cutânea concomitantemente.



Figura 2 – Capítulo III. Célula de Franz manual utilizada para o estudo de permeação/penetração cutânea.



Figura 3 – Capítulo IV. Retirada da epiderme das amostras de pele humana, para o estudo de permeação cutânea.



Figura 4 – Capítulo IV. Células automáticas de Franz (Microette Plus[®], Hanson Research)



Figura 5 – Capítulo VI. Célula de Franz manual com aplicação de suspensão de nanocápsulas fluorescentes na superfície da pele

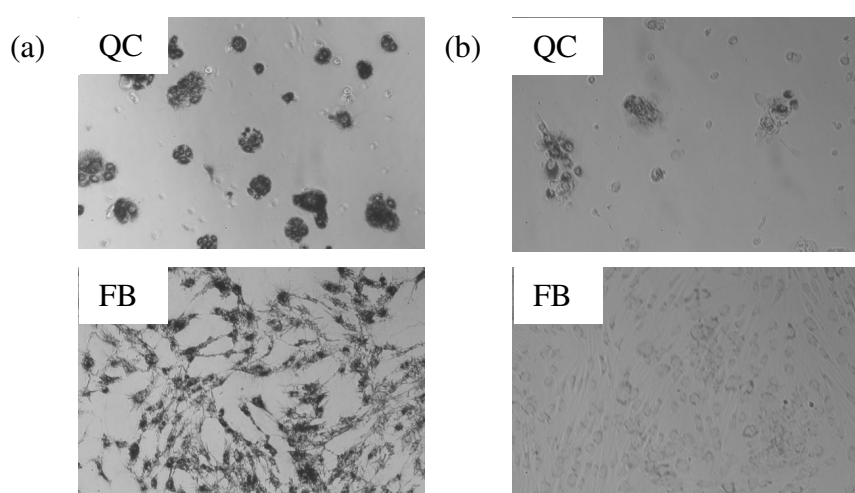


Figura 6 – Capítulo VI. Queratinócitos (QC) e fibroblastos (FB) em cultura após o teste de citotoxicidade: (a) MTT (b) Vermelho Neutro

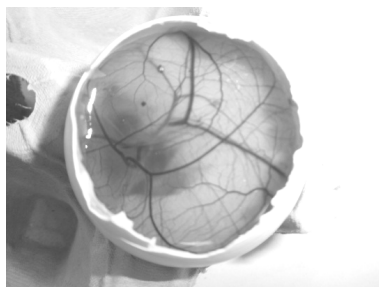


Figura 7 – Capítulo VI. Membrana corioalantóide exposta para o teste do HET-CAM (potencial irritante).



Figura 8 – Capítulo VII. Aplicação das formulações durante o estudo de análise sensorial.