

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

**Sistema de Liberação Controlada Baseado em Vesículas de  
poli(estireno-*b*-óxido de etileno) Carregadas com Adapaleno  
Inseridas em Filmes Poliméricos**

Autora: Viviane Silva Brey Gil

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Gisele Assis Castro Goulart Abril/2017

Viviane Silva Brey Gil

Sistema de Liberação Controlada Baseado em Vesículas de poli(estireno-*b*-  
óxido de etileno) Carregadas com Adapaleno Inseridas em Filmes Poliméricos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de  
Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e  
de Minas.

Área de Concentração: Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Gisele Assis Castro Goulart

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Engenharia  
2017

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e meu marido, pelo apoio e incentivo para a conclusão deste curso, e a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que mais uma etapa em minha vida fosse vencida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por iluminar o meu caminho e por me dar a força necessária para superar todos os obstáculos que encontrei nessa jornada.

Aos meus pais, todo o amor e gratidão que sou capaz de sentir, pois sem vocês a finalização desta etapa não seria possível. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e serem o meu porto seguro, mas principalmente por sempre acreditar na minha capacidade, mesmo quando eu mesma não fui capaz de crer.

À minha irmã e companheira de jornada que tanto amo, toda a minha admiração, meu orgulho e gratidão. Você foi e continuará sendo meu exemplo, agradeço pelo tempo e conhecimentos dedicados a mim, e pela paciência que foi necessária para a conclusão desse trabalho.

Ao meu marido Eduardo, agradeço por estar sempre ao meu lado, mas principalmente pela paciência e perseverança que nos mantiveram firmes nesses 2 anos de ausência. Seu incentivo e apoio foram essenciais para que eu pudesse vencer mais essa etapa. Considere esta, uma conquista para nossa vida.

Aos meus avós, e em especial à minha Vó Ceição, que tenho certeza, tem olhado por mim lá do alto, por toda a preocupação e zelo.

À Prof.<sup>a</sup> Gisele Goulart, agradeço por toda paciência e ajuda que a mim foi dispensada. Sou imensamente grata por toda atenção dada a mim. Sei que sem seu apoio esse trabalho não estaria concluído.

Ao Dr. Rodrigo Oréfice, por todo conhecimento a mim passado e por ter aceitado o desafio de me orientar.

Aos amigos do LEPCoM que compartilharam momentos de alegria e dor nesses 2 anos de caminhada.

Ao Prof. Ulrich Wiesner da Cornell University por ter cedido o copolímero utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Luiz Oliveira do Departamento de Química da UFMG por ter cedido o colágeno utilizado.

À todos aqueles que fazem parte da minha vida, e que de certa forma estiveram presentes nesta caminhada.

À CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE NOTAÇÕES .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Nanotecnologia e Sistema de Liberação de Fármaco.....	19
3.2 Copolímeros em Bloco Anfifílico .....	20
3.2.1 Vesículas Poliméricas .....	24
3.2.2 PS- <i>b</i> -PEO .....	26
3.3 Adapaleno .....	27
3.4 Filmes de Colágeno e Gelatina como Curativos para Lesões por Queimadura .....	29
<b>4. MÉTODO.....</b>	<b>32</b>
4.1 Materiais Utilizados .....	32
4.2 Síntese das Vesículas Poliméricas (VP's) .....	32
4.3 Filmes de Colágeno.....	33
4.3.1 Preparo da Solução de Colágeno.....	33
4.3.2 Determinação da Concentração de Colágeno na Solução .....	33
4.3.3 Preparo dos Filmes de Colágeno .....	34
4.4 Filmes de Gelatina.....	34
4.4.1 Filmes de Gelatina Pura.....	34
4.4.2 Filmes de Gelatina contendo Sulfadiazina de Prata .....	34
4.4.3 Filmes de Gelatina contendo Sulfadiazina de Prata e Vesículas Poliméricas carregadas com Adapaleno.....	35
4.4.4 Filmes de Gelatina contendo Adapaleno .....	35
4.5 Determinação da concentração do AD por espectrofotometria na região do UV	

.....	35
4.5.1 Avaliação da seletividade .....	36
4.5.2 Linearidade da curva analítica para determinação do AD nas vesículas poliméricas.....	36
4.5.3 Linearidade da curva analítica para determinação do AD nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> .....	37
4.5.4 Linearidade da curva analítica para determinação da SSD nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> .....	38
4.5.5 Análise estatística .....	39
4.5.6 Limite de detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	39
4.6 Caracterização .....	40
4.6.1 Caracterização morfológica das vesículas produzidas com copolímero em bloco por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	40
4.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) .....	40
4.6.3 Potencial Zeta .....	41
4.6.4 Avaliação da Presença de Solvente por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	41
4.6.5 Termogravimetria (TG).....	41
4.6.6 Determinação do Teor de Encapsulação do Adapaleno nas vesículas poliméricas.....	42
4.6.7 Análise da Presença de Cristais de Adapaleno por Microscopia de Luz Polarizada.....	43
4.6.8 Análise do pH de Superfície dos Filmes de Colágeno e Gelatina .....	43
4.6.9 Liberação <i>in Vitro</i> .....	43
4.6.10 Estudo de Liberação do Adapaleno pelas Vesículas Poliméricas.....	43
4.6.11 Ensaio de Liberação <i>in Vitro</i> dos Fármacos Adapaleno e Sulfadiazina de Prata pelos Filmes de Colágeno e Gelatina.....	44
4.6.12 Cinética de liberação .....	45
4.6.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	46
<b>5.. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>47</b>
5.1 Preparação das VP's e Filmes de Gelatina e Colágeno.....	47
5.2 Determinação do Teor de Encapsulação do Adapaleno nas Vesículas Poliméricas .....	50
5.3 Caracterização Morfológica das VP's .....	51
5.4 Avaliação da Presença de Solvente na Formulação por FTIR.....	55
5.5 Termogravimetria (TG) .....	58

5.6 Análise da Presença de Cristais de Adapaleno por Microscopia de Luz Polarizada .....	60
5.7 pH de Superfície.....	61
5.8 Ensaio de Liberação.....	63
5.8.1 Avaliação da Solubilidade dos Fármacos no Meio de Dissolução .....	63
5.8.2 Determinação do Adapaleno no Estudo de Liberação.....	64
5.8.3 Determinação da Sulfadiazina de Prata no Estudo de Liberação .....	66
5.8.4 Estudo de Liberação do Adapaleno a partir das Vesículas Poliméricas.....	67
5.8.5 Estudo de Liberação do Adapaleno pelos Filmes de Gelatina e Colágeno.....	71
5.8.6 Estudo de Liberação da Sulfadiazina de Prata pelos Filmes de Gelatina e Colágeno.....	78
5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	87
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> - Tipos de sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos. Adaptado de LETCHFORD; BURT, 2007 .....	20
<b>Figura 3.2</b> - Classificação dos copolímeros de acordo com o arranjo sequencial dos monômeros: a) em Bloco, b) Alternado, c) Aleatório e d) Enxertado. Adaptado de SILVA, 2015 .....	21
<b>Figura 3.3</b> - Classificação dos copolímeros de acordo com o arranjo dos seus blocos: a) Dibloco, b) Tribloco, c) Multibloco e d) Estrela. Fonte: Adaptado de SILVA, 2015 .....	21
<b>Figura 3.4</b> - Sistema de liberação controlada nanoparticulado formado por copolímeros em bloco anfífilicos e suas características gerais. Adaptado de (LETCHFORD; BURT, 2007) .....	23
<b>Figura 3.5</b> - Imagens por TEM de vesículas associadas a partir de 0,1% de PDMS8-PEG6 sob a mesma proporção de água e THF (A); 0,1% PDMS8-PEG23 sob a mesma proporção de água e THF (B); 0,1% PDMS81-PEG23 sob uma proporção de água/THF de 1.5 (C) e 5(D). Fonte: LI <i>et al.</i> , 2010 .....	24
<b>Figura 3.6</b> - Representação de VP's: a) Imagem microscópica de vesículas compostas por PS- <i>b</i> -PEO e b) Ilustração da parte interna das VP's. Fonte: LEE; FEIJEN, 2012 .....	25
<b>Figura 3.7</b> - Representação da estrutura química do copolímero em bloco PS- <i>b</i> -PEO Fonte: WU <i>et al.</i> , 2011 .....	26
<b>Figura 3.8</b> - Estrutura química do Adapaleno. Fonte: MUKHERJEE <i>et al.</i> , 2006 .....	28
<b>Figura 3.9</b> - Estrutura do Colágeno: a) Sequência primária de aminoácidos; b) Tropocolágeno; e c) Estrutura tripla hélice. Fonte: VULCANI, 2004 .....	30
<b>Figura 5.1</b> - Solução contendo PS460- <i>b</i> -PEO230 e Adapaleno dissolvidos em 1,4-dioxano durante adição lenta de água (A) e (B); Dispersão após a adição do excesso de água (C) e (D); e Dispersão final obtida após a rotoevaporação e filtração (D) e (E) .....	48
<b>Figura 5.2</b> - Filmes de gelatina puro e contendo AD livre .....	49
<b>Figura 5.3</b> - Filmes de colágeno puro e contendo AD livre .....	49
<b>Figura 5.4</b> - Curva analítica para o Adapaleno em THF e Metanol realizado em UV-Vis .....	51
<b>Figura 5.5</b> - Imagens de TEM das vesículas de PS-PEO: a, b e c correspondem às NP's sem o fármaco; d, e e f correspondem às NP's carregada com AD .....	53
<b>Figura 5.6</b> - Estrutura química do 1,4-dioxano. Fonte: Sigma Aldrich .....	56
<b>Figura 5.7</b> - Espectro de FTIR do 1,4-dioxano, formulação contendo vesículas sem adapaleno e formulação contendo vesículas com adapaleno .....	57
<b>Figura 5.8</b> - Análise da TG do copolímero PS-PEO, do Adapaleno e das Vesículas carregadas com o AD .....	59
<b>Figura 5.9</b> - Imagens de microscopia de luz polarizada indicando a presença de cristais de adapaleno na amostra sem filtrar (a) e a ausência dos cristais de adapaleno na amostra após filtrar (b) .....	61
<b>Figura 5.10</b> - Amostras de 8mm dos filmes de gelatina e colágeno, respectivamente .....	62

<b>Figura 5.11</b> - Suspensão de AD e SSD após 24 horas de agitação e aquecimento a 37°C.....	64
<b>Figura 5.12</b> - Curva analítica para o Adapaleno em Solução PBS:Etanol + T60 realizado em UV-Vis.....	65
<b>Figura 5.13</b> - Curva analítica para a Sulfadiazina de Prata em Solução PBS:Etanol + T60 realizado em UV-Vis.....	67
<b>Figura 5.14</b> - Perfil de liberação de AD pelas VP's.....	68
<b>Figura 5.15</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Ordem Zero .....	69
<b>Figura 5.16</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Primeira Ordem.....	69
<b>Figura 5.17</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi.....	70
<b>Figura 5.18</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell.....	70
<b>Figura 5.19</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. ....	71
<b>Figura 5.20</b> - Perfil de liberação de AD pelos filmes de gelatina .....	72
<b>Figura 5.21</b> - Perfil de liberação de AD pelos filmes de colágeno .....	73
<b>Figura 5.22</b> - Representação gráfica do modelo cinético de ordem zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno. ....	74
<b>Figura 5.23</b> - Representação gráfica do modelo cinético de primeira ordem. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno .....	75
<b>Figura 5.24</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno. ....	76
<b>Figura 5.25</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno .....	77
<b>Figura 5.26</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno .....	78
<b>Figura 5.27</b> - Perfil de liberação de SSD pelos filmes de gelatina. ....	79
<b>Figura 5.28</b> - Perfil de liberação de SSD pelos filmes de colágeno. ....	80
<b>Figura 5.29</b> - Representação gráfica do modelo cinético de ordem zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno. ....	81
<b>Figura 5.30</b> - Representação gráfica do modelo cinético de primeira zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno. ....	82
<b>Figura 5.31</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno. ....	83
<b>Figura 5.32</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno .....	84
<b>Figura 5.33</b> - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno .....	85
<b>Figura 5.34</b> - Imagem MEV da superfície de fratura de filmes de colágeno: (a) e (b) puro; (c) e (d) contendo AD; (e) e (f) contendo SSD; (g) e (h) contendo SSD e VP's carregadas com AD .....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> - Concentrações utilizadas para montagem da Curva Analítica do Adapaleno em Solução Tampão PBS .....	38
<b>Tabela 4.2</b> - Composição da solução tampão PBS pH 7,4.....	38
<b>Tabela 4.3</b> - Concentrações utilizadas para montagem da Curva Analítica da Sulfadiazina de Prata em Solução Tampão PBS.....	39
<b>Tabela 4.4</b> - Interpretação do mecanismo de liberação por difusão a partir de filmes poliméricos.....	46
<b>Tabela 5.1</b> - Resultado da caracterização das vesículas vazias por DLS.....	54
<b>Tabela 5.2</b> - Resultado da caracterização das vesículas carregadas com adapaleno por DLS.....	54
<b>Tabela 5.3</b> - Valor do pH da superfície dos filmes de colágeno e gelatina.....	62
<b>Tabela 5.4</b> - Solubilidade do AD no meio de dissolução.....	63
<b>Tabela 5.5</b> - Solubilidade do AD no meio de dissolução.....	64
<b>Tabela 5.6</b> - Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo.....	68
<b>Tabela 5.7</b> - Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de gelatina.....	72
<b>Tabela 5.8</b> - Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de colágeno.....	72
<b>Tabela 5.9</b> - Valores médio de concentração de SSD, por tempo e acumulada, e taxa de SSD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de gelatina.....	79
<b>Tabela 5.10</b> - Valores médios de concentração de SSD, por tempo e acumulada, e taxa de SSD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de colágeno.....	80

## LISTA DE NOTAÇÕES

ABC - Copolímero em Bloco Anfifílico  
AD – Adapaleno  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BMDM - Macrófagos derivados de medula óssea  
CH<sub>3</sub>COOH - Ácido acético  
DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico  
FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier  
Gly - Glicina  
HCl - Ácido clorídrico  
Hyp - Hidroxiprolina  
IP - Índice de Polidispersão  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato Monobásico de Potássio  
LD - Limite de detecção  
LEPCOM - Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos  
LQ - Limite de quantificação  
NaCl - Cloreto de Sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato de Sódio Dibásico Anidro  
NIH - National Institutes of Health  
NIST - National Institute of Standards and Technology  
NP - Nanopartícula Polimérica  
PBS - Solução tampão fosfato salina  
PDMS - Polidimetilsiloxano  
PEG - Polietileno glicol  
PEGMEMA - Polietileno glicol metil éter metacrilato  
PEO - Polióxido de Etileno  
PLA - Poli(ácido láctico)  
Pro - Prolina  
PS - Poliestireno  
PVA - Polivinil álcool  
RAR - Receptores de Ácido Retinóico  
RPM - Rotações por minuto  
SLC - Sistema de Liberação Controlada  
SSD - Sulfadiazina de Prata

TC - Tropocolágeno

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

THF - Tetrahidrofurano

Tween 60 - Monooleato de sorbitanoetoxilado

UV-Vis - Ultravioleta-visível

VP - Vesícula Polimérica

## RESUMO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos integram a nova geração de produtos farmacêuticos. Por se tratar de um sistema terapêutico que reduz o risco de intoxicação ao paciente, causa menos incômodo e aprimora a ação do fármaco no organismo, têm sido muito estudados no desenvolvimento e aplicação da nanotecnologia. As vesículas poliméricas são estruturas esféricas ocas, com dimensões nanométricas, que são utilizadas em sistemas de liberação controlada por se mostrarem capazes de penetrar barreiras biológicas. Neste trabalho, foi aplicada a técnica de cossolvente para a síntese de vesículas utilizando o copolímero em bloco poli(estireno-*b*-óxido de etileno). Foram sintetizadas vesículas vazias e carregadas com o fármaco hidrofóbico adapaleno (AD), encapsulado na membrana. O AD tem sido utilizado principalmente no tratamento anti-acne, mas também é objeto de vários estudos, por sua capacidade de atuar nos processos celulares, melhorando a renovação celular. As vesículas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta. Foi avaliada, nas formulações, a presença de cristais do fármaco pós-filtragem através da Microscopia de Luz Polarizada, e também a presença do solvente 1,4-dioxano através da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Foi avaliado o teor de AD encapsulado pelas vesículas e a sua capacidade de liberação através de ensaios utilizando-se a Espectroscopia de Absorção de Radiação na Região Ultravioleta-visível (UV-Vis). As vesículas foram incorporadas em filmes de gelatina e colágeno juntamente com AD e sulfadiazina de prata (SSD) livres. Os filmes foram avaliados quanto à sua capacidade de liberação do AD e da SSD através do estudo de liberação *in vitro*, sendo as amostras coletadas analisadas através do UV-Vis. Os resultados obtidos comprovaram a viabilidade da produção das vesículas poliméricas vazias e carregadas com o AD, mesmo que o valor do teor encapsulado tenha se apresentado abaixo do esperado. Comprovaram também a eficiência das vesículas na liberação do fármaco, assim como dos filmes de gelatina e colágeno, que apresentaram pH levemente ácido, mostrando-se adequados para aplicação como curativo.

Palavras-chave: Sistema de liberação controlada, copolímeros em bloco, vesículas, adapaleno.

## ABSTRACT

Controlled drug delivery systems are part of the new generation of pharmaceuticals. Because it is a therapeutic system that reduces the risk of intoxication to the patient, causes less discomfort and improves the action of the drug in the body, this has been a very studied area in the development and application of nanotechnology. Polymer vesicles are hollow spherical structures, with nanometric dimensions, capable of penetrating biological barriers, especially in diseased tissues. In this work, the co-solvent technique was applied for the synthesis of vesicles using poly(styrene-*b*- ethylene oxide) block copolymer, where poly(ethylene oxide) formed the inner and outer layers of the structure and polystyrene formed its membrane. Empty vesicles and vesicles loaded with the membrane-encapsulated hydrophobic adapalene drug were synthesized, which has been used mainly in anti-acne treatments, but is also the object of several studies, for their ability to act in cellular processes, improving their capacity of renewal. The vesicles were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential. Assessments were also made for the presence of post-filtering drug crystals through Polarized Light Microscopy, the presence of the 1,4-dioxane solvent in the formulations containing the empty vesicles and loaded with the drug through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), the content of adapalene encapsulated by the vesicles and their release capacity through Ultraviolet-Visible (UV-Vis) tests. The obtained vesicles were incorporated into gelatin and collagen together with free Adapalene and silver sulfadiazine. Films were evaluated for their ability to release Adapalene and Silver Sulfadiazine through the *in vitro* release study, and the collected samples were analyzed through UV-Vis. The obtained results proved the viability of the production of empty and AD-loaded polymer vesicles, although the value of the encapsulated content was less than expected. The results also showed the efficiency of the vesicles in the release of the drug, as well as the films of gelatin and collagen, which presented slightly acidic pH, similar to skin, and are suitable for application as a dressing.

*Keywords: Controlled release system, block copolymers, vesicles, adapalene.*

## Capítulo 1: Introdução

Sistema de Liberação Controlada de Fármacos (SLC) é uma tecnologia que integra a nova geração de produtos farmacêuticos e que proporciona a liberação de fármacos em uma quantidade e um período de tempo previamente determinados. O SLC tem como premissa a otimização das propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, maximizando sua ação, reduzindo os efeitos colaterais e promovendo a cura ou o controle da doença no menor tempo possível (SRIKANTH *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, uma grande variedade de SLC vem sendo estudada. Dentre os materiais utilizados para a obtenção das SLC, destaca-se o uso de materiais poliméricos, devido a fatores como biodegradabilidade, baixo custo, baixa toxicidade e versatilidade (UHRICH *et al.*, 1999). É grande o número de materiais poliméricos com potencial aplicação farmacêutica, como o colágeno, a quitosana, o poli(ácido lático), as poliamidas e mais recentemente o uso de copolímeros (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

Os copolímeros representam a possibilidade de combinar, em um único material, propriedades distintas de diferentes polímeros. Eles são compostos de uma ou mais unidades de repetição diferentes, podendo ser classificados em quatro tipos: os copolímeros aleatórios, os copolímeros alternados, os copolímeros enxertados e os copolímeros em bloco (KUMAR; RAVIKUMAR; DOMB, 2001), sendo este último o tipo estudado neste trabalho. Copolímeros em bloco consistem em dois ou mais blocos de polímeros quimicamente distintos ligados covalentemente entre si. Estes blocos podem ser termodinamicamente incompatíveis uns com os outros (como óleo e água) e são utilizados para várias aplicações, incluindo a produção de nanopartículas para liberação controlada de fármacos (DARLING, 2007).

As nanopartículas poliméricas (NP's) são amplamente estudadas para aplicação em SLC, pois, em geral, apresentam características que contribuem para um maior potencial na liberação de fármacos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Diferentes tipos de nano-transportadores têm sido desenvolvidos para aplicação na liberação de fármacos, entre eles podemos citar as vesículas poliméricas, que são estruturas esféricas ocas, que exibem dimensões que podem variar de nanômetros até centenas de micrômetros. Sua morfologia permite que sejam utilizadas para encapsulamento de



vários agentes no interior do núcleo ou em sua membrana (KITA-TOKARCZYK *et al.*, 2005).

As vesículas de copolímeros em bloco têm atraído grande atenção ultimamente, uma vez que possuem a capacidade de encapsular tanto componentes hidrofílicos como hidrofóbicos, de acordo com os materiais que compõem a sua casca interna e também a sua membrana. Quando o núcleo é composto por cadeias hidrofílicas, o material encapsulado deve apresentar característica hidrofílica, já a membrana será composta por cadeias hidrofóbicas sendo capaz de encapsular espécies hidrofóbicas, e vice-versa. Esta é uma característica que torna as vesículas poliméricas muito úteis para utilização em aplicações biomédicas (DU; ARMES, 2009; VENKATARAMAN *et al.*, 2011). Outro fator que podemos citar também é que estas vesículas poliméricas apresentam vantagens sobre aquelas que são preparadas a partir de lipídios, pois suas membranas mostram-se mais estáveis mecanicamente e mais resistentes a estímulos externos e suas propriedades são facilmente e precisamente ajustáveis pela composição do copolímero e pelas condições ambientais (KITA-TOKARCZYK *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2008).

O Adapaleno é um fármaco que atua no processo de renovação celular e apresenta um menor potencial de toxicidade quando comparado a outros retinóides, mostrando-se melhor tolerado nos tratamentos da pele (SHI *et al.*, 2012). Baseando-se em trabalhos já publicados (NUNES *et al.*, 2011 e 2016; GIL *et al.*, 2016), onde foram produzidos filmes de gelatina e colágeno contendo nanopartículas e até mesmo o fármaco puro dispersos, para aplicação em lesões de queimaduras dérmicas, úlceras e feridas infectadas, atuando como SLC, surgiu o interesse em utilizar as vesículas contendo o AD encapsulado, realizando a sua inserção em filmes à base de colágeno e gelatina para aplicação em lesões ocasionadas por queimaduras. Nestes filmes seria inserido ainda o fármaco adapaleno em sua forma livre a fim de garantir uma ação imediata, e também a sulfadiazina de prata, que é um agente antimicrobiano que apresenta um grande espectro de atividade bactericida. A ação do AD será prolongada através da liberação gradativa realizada pelas VP's. Esses curativos atuariam como sistema de liberação controlada proporcionando uma melhora no processo de cicatrização, prevenindo o desenvolvimento de respostas inflamatórias e infecciosas, além de apresentar a vantagem de não precisar ser removido para troca.

No presente trabalho foram desenvolvidas nanopartículas utilizando o copolímero em bloco poli(estireno-*b*-óxido de etileno) (PS-PEO) para o encapsulamento de fármacos. As nanopartículas sintetizadas foram formadas por cascas hidrofílicas (PEO), internas e externas, e por uma membrana hidrofóbica (PS) que encapsulou o fármaco de natureza hidrofóbica Adapaleno (AD). Estas nanopartículas foram inseridas em filmes de gelatina e colágeno a fim de que atuem como um sistema de liberação controlada. Os filmes são úteis ainda para imobilizar as nanopartículas e criar um ambiente mais compatível com tecidos vivos.

## Capítulo 2: Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização de vesículas de copolímero em bloco PS-*b*-PEO, contendo o fármaco adapaleno encapsulado, realizando a sua incorporação em materiais à base de colágeno e gelatina, inserindo também concentrações dos fármacos sulfadiazina de prata e adapaleno livres, investigando a capacidade destes materiais de realizar a liberação *in vitro* dos fármacos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar vesículas de copolímero PS-*b*-PEO contendo fármaco AD;
- ✓ Caracterizar as vesículas poliméricas utilizando-se as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- ✓ Determinar o teor de fármaco incorporado e a eficiência de encapsulamento nas vesículas poliméricas através da espectroscopia de absorção de radiação na região ultravioleta-visível (UV-Vis);
- ✓ Validar os métodos analíticos através da avaliação da seletividade, da linearidade das curvas analíticas construídas, da análise estatística, do cálculo do limite de detecção e de quantificação e também da avaliação da cinética de liberação.

## Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

### 3.1 Nanotecnologia e Sistema de Liberação de Fármaco

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que envolve a criação e manipulação de materiais em níveis de nanoescala para produção, caracterização e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas que apresentam propriedades inovadoras (DOWLING, 2004; MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). A nanotecnologia tem sido amplamente desenvolvida para aplicação em áreas distintas da medicina, como imagem, diagnóstica e terapêutica, e devido a isso, esses produtos são referidos como nanomedicamentos pelo National Institutes of Health - NIH (LANGER; WEISSLEDER, 2015; MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2016).

Nanopartículas são estruturas coloidais cujo tamanho pode variar de 1 a 999nm, onde agentes terapêuticos podem ser encapsulados, adsorvidos ou conjugados sob sua superfície, atuando como um veículo para liberação de fármacos ou marcadores terapêuticos. Para o desenvolvimento dessas nanopartículas pode-se utilizar diversos tipos de materiais, como lipídios, polímeros, e alguns materiais inorgânicos (Figura 3.1) (LETCHFORD; BURT, 2007; HALEY; FRENKEL, 2008; BENNET; KIM, 2014). A possibilidade de produzir essas nanopartículas com diferentes composições resulta na formação de SLC's com características físico-químicas e aplicações variadas.

Podemos citar como as principais vantagens desses sistemas: a melhoria da biodisponibilidade através do aumento da solubilidade aquosa; o aumento da resistência do fármaco no organismo, ou seja, prolonga o tempo de exposição do fármaco; a liberação do fármaco em um local específico do corpo, além da diminuição da dose e toxicidade do fármaco (LETCHFORD; BURT, 2007; MUDSHINGE et al., 2011).

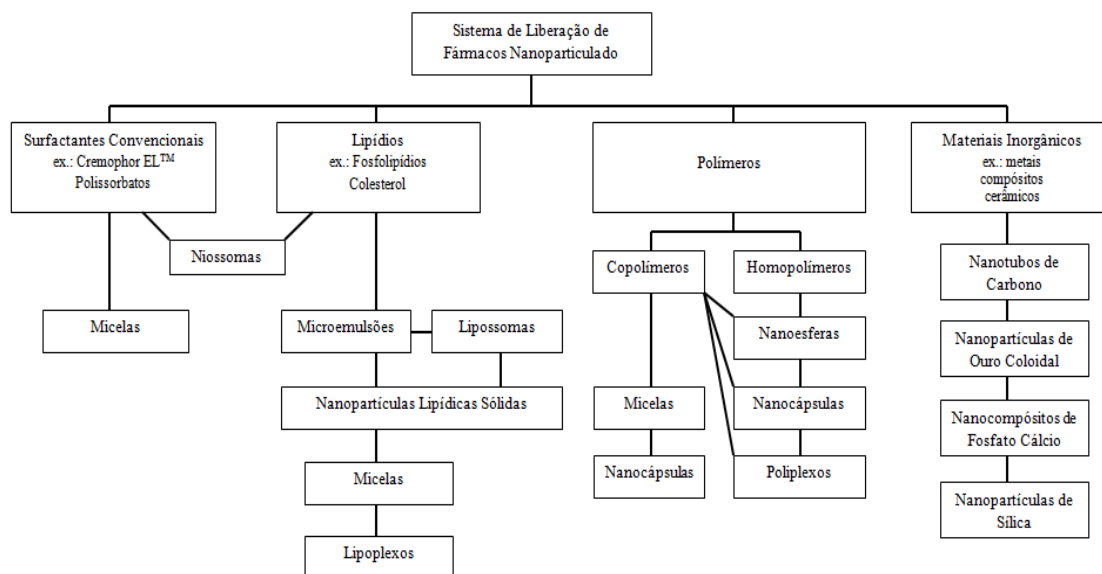


Figura 3.1: Tipos de sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos. Adaptado de LETCHFORD; BURT, 2007.

### 3.2 Copolímeros em Bloco Anfifílico

Os copolímeros são estruturas formadas pela combinação de unidades de repetição quimicamente distintas. Essas unidades de repetição, conhecidas como meros, possuem a capacidade de alterar as propriedades do material, devido ao seu arranjo sequencial na extensão da cadeia polimérica. De acordo com esse arranjo, os copolímeros, recebem as seguintes classificações: copolímeros em bloco, copolímeros alternados, copolímeros aleatórios e copolímeros enxertados, conforme nos mostra a Figura 3.2 (BATES; FREDRICKSON, 1990; ORÉFICE, 2007).

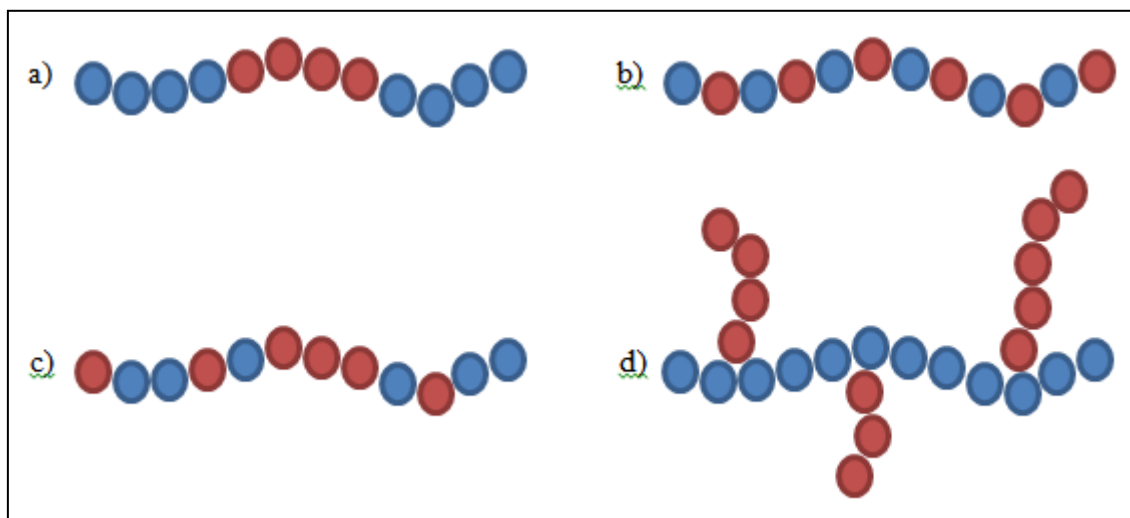


Figura 3.2: Classificação dos copolímeros de acordo com o arranjo sequencial dos monômeros: a) em Bloco, b) Alternado, c) Aleatório e d) Enxertado. Adaptado de SILVA, 2015.

Os copolímeros em bloco também são divididos em quatro classes distintas, variando de acordo com o arranjo sequencial de seus blocos, podendo ser dibloco, tribloco, multibloco ou estrela, como representado na Figura 3.3 (BATES; FREDRICKSON, 1990; KUMAR *et. al.*, 2001)

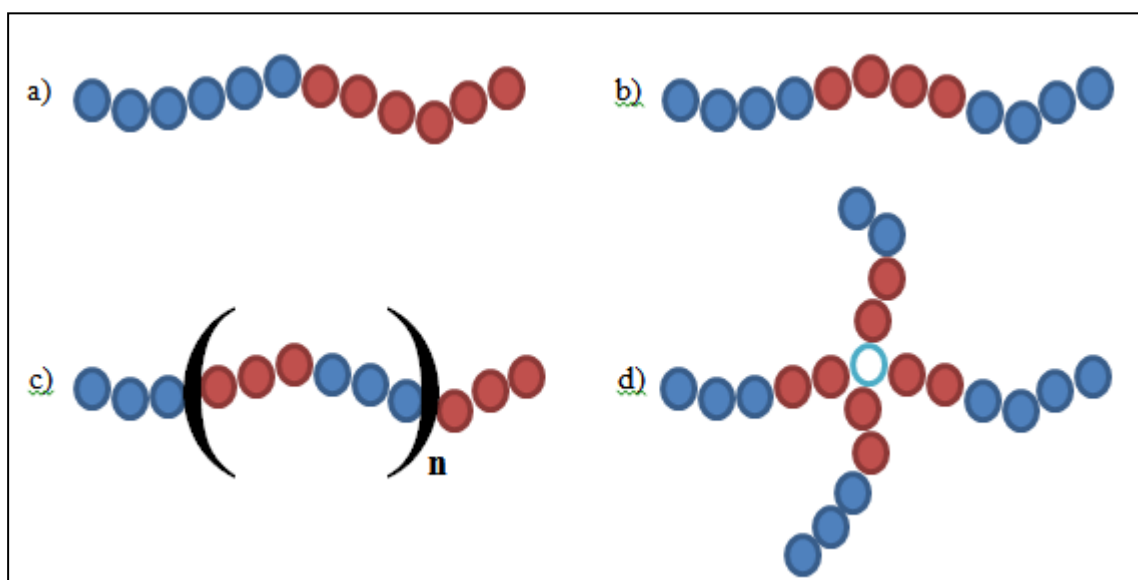


Figura 3.3: Classificação dos copolímeros de acordo com o arranjo dos seus blocos: a) Dibloco, b) Tribloco, c) Multibloco e d) Estrela. Fonte: Adaptado de SILVA, 2015.

Os copolímeros em bloco anfifílicos (ABC's) consistem de dois ou mais blocos hidrofílicos e hidrofóbicos ligados covalentemente. Devido às características distintas desses blocos, a molécula resultante é composta de regiões que possuem afinidades opostas ao meio aquoso (KANAPATHIPILLAI, 2008; KLAIKHERD; NAGAMANI; THAYUMANAVAN, 2009). Uma vez que a maioria dos fármacos utilizados são hidrofóbicos, a utilização de moléculas anfifílicas é de fundamental interesse para aplicações na biotecnologia e medicina, permitindo a síntese em meio aquoso de estruturas contendo fármacos hidrofóbicos. Em solução aquosa, os ABC's podem se auto associar em várias estruturas ordenadas, formando uma nanopartícula com núcleo contendo segmentos hidrofóbicos e revestimento externo contendo segmentos hidrofílicos. Os fármacos podem ser carregados no núcleo, enquanto o revestimento promove a estabilização da nanopartícula (YU; EISENBERG, 1996; DISCHER, 1999).

É amplo o número de estudos realizados utilizando-se copolímeros em bloco anfifílicos de diferentes composições para produção de nanopartículas como micelas, esferas, polimersomas e nanocápsulas (Figura 3.4). Estes produtos podem ter características como tamanho e forma controlados por fatores como a relação entre os segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, que determinarão a morfologia encontrada, a concentração, o pH e a temperatura da solução, e também o tipo de solvente utilizado (KITA-TOKARCZYK *et. al.*, 2005; KLAIKHERD; NAGAMANI; THAYUMANAVAN, 2009; BRINKHUIS; RUTJES; VAN HEST, 2011).

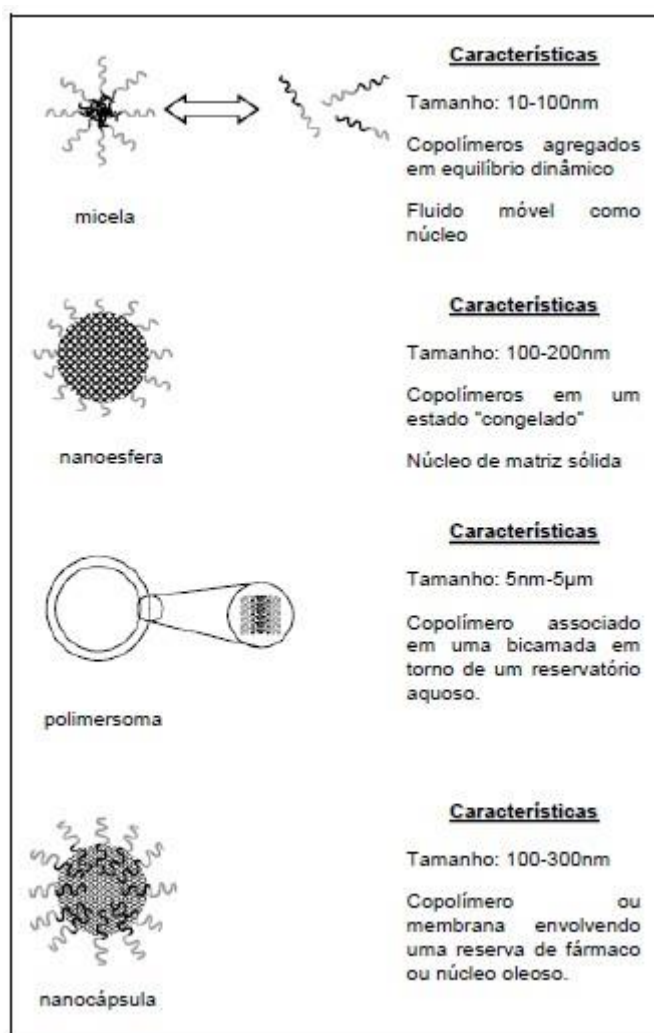


Figura 3.4: Sistema de liberação controlada nanoparticulado formado por copolímeros em bloco anfifílicos e suas características gerais. Adaptado de (LETCHEFORD; BURT, 2007).

No trabalho descrito por LI *et al.*, 2010, foi realizada a síntese de nanocápsulas a partir dos copolímeros em bloco anfifílicos poli (dimetilsiloxano-b-etileno glicol) (PDMS-b-PEG) encapsulando Hypocrellin B como modelo de fármaco hidrofóbico em mistura de solvente tetrahidrofurano (THF) e água. Foi possível variar o tamanho da vesícula através do ajuste da razão em volume de água para THF e também a concentração de copolímeros. Observou-se que quanto maior o volume de água adicionado à mistura de solvente, menores são as vesículas, enquanto que quanto maior a concentração de polímeros, maiores são as vesículas formadas, conforme mostra a Figura 3.5. Foi possível observar também a encapsulação do fármaco hidrofóbico pelo domínio hidrofóbico da vesícula, através de uma interação hidrofóbica, mostrando que as



vesículas produzidas possuem grande potencial para atuação como sistemas de bioliberação.

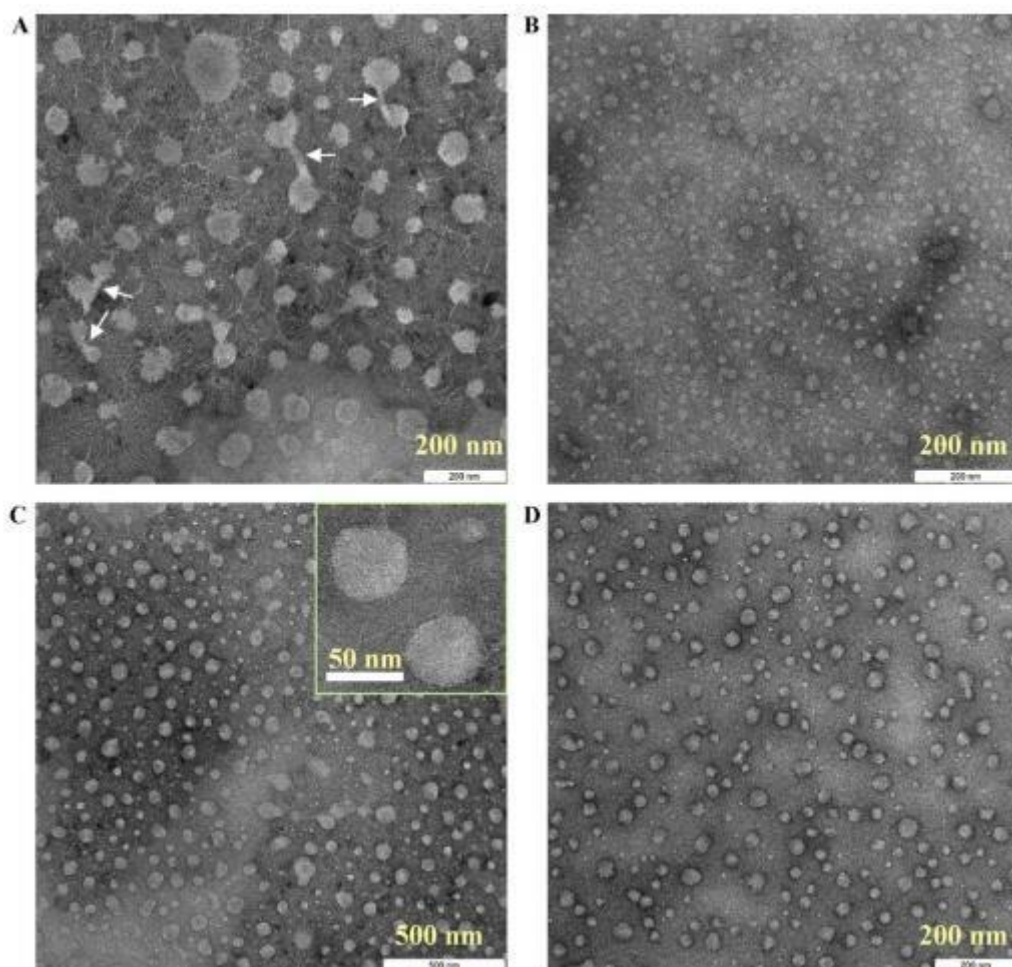


Figura 3.5 - Imagens por TEM de vesículas associadas a partir de 0,1% de PDMS<sub>8</sub>-PEG<sub>6</sub> sob a mesma proporção de água e THF (A); 0,1% PDMS<sub>8</sub>-PEG<sub>23</sub> sob a mesma proporção de água e THF (B); 0,1% PDMS<sub>81</sub>-PEG<sub>23</sub> sob uma proporção de água/THF de 1.5 (C) e cinco (D). Fonte: LI *et al.*, 2010.

### 3.2.1 Vesículas Poliméricas

As vesículas poliméricas VP's são partículas coloidais de formato esférico oco, como é possível observar na Figura 3.6, cujas dimensões variam entre nanômetros até centenas de micrômetros, podendo ser formadas a partir de uma gama diversificada de copolímeros em bloco anfifílicos (KITA-TOKARCZYK *et al.*, 2005; BANSAL; KASHYAP, 2012). Ao contrário das vesículas lipídicas, as vesículas poliméricas são consideradas mais rígidas, estáveis e versáteis, e a sua similaridade com as membranas biológicas

as torna um modelo mais atraente para aplicação em células e organelas, além de sua capacidade de incorporar componentes hidrofílicos e hidrofóbicos (CHOUCAIR; LAVIGUEUR; EISENBERG, 2004; RIJCKEN *et al.*, 2007). Essas características possibilitam que essas vesículas sejam amplamente utilizadas em aplicações distintas como a liberação controlada de fármacos (DI MARZIO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015), a aplicação de marcadores (MA; CHENG, 2006; THET *et al.*, 2013), tratamentos dermatológicos (SINICO *et al.*, 2005; CASTANGIA *et al.*, 2015), e também na engenharia civil, no melhoramento de cimentos e concretos (HU *et al.*, 2012a, 2012b).

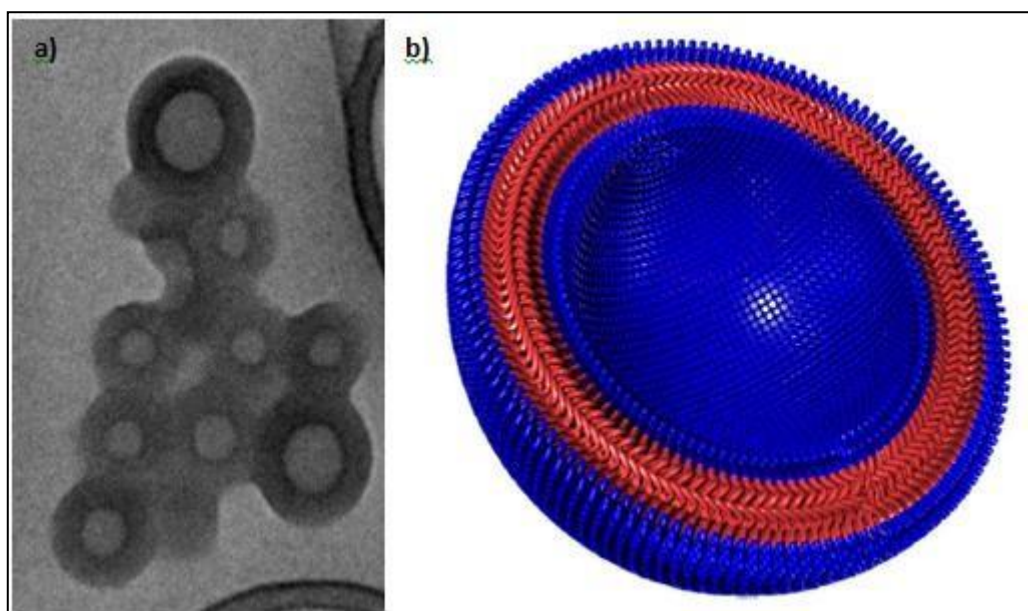


Figura 3.6: Representação de VP's: a) Imagem microscópica de vesículas compostas por PS-*b*-PEO e b) Ilustração da parte interna das VP's. Fonte: LEE; FEIJEN, 2012.

Dentre as diferentes metodologias utilizadas para o preparo das vesículas poliméricas podemos destacar as mais utilizadas, como a técnica por cossolvente e a técnica livre de solventes. A primeira técnica envolve o uso de solventes orgânicos compatíveis com ambos os blocos do copolímero anfifílico, obtendo-se assim sua dissolução. Em seguida, é realizada a adição gradativa de água à solução, que é considerada um solvente seletivo para o bloco hidrofílico, fazendo com que os blocos hidrofóbicos se associem formando a membrana da vesícula onde os blocos hidrofílicos formarão uma espécie de coroa a fim de promover a estabilização vesicular. Esta auto associação é interrompida quando um excesso de água é adicionado. Através do uso de uma técnica

adequada, o solvente orgânico é removido da solução, que finalmente é filtrada. A segunda técnica envolve apenas o uso de água para reidratação do copolímero, que se encontra sob a forma de filmes. A hidratação do copolímero é responsável pela formação das vesículas (SOO; EISENBERG, 2004; KITA- TOKARCZYK *et al.*, 2005; DU; O'REILLY, 2009).

### 3.2.2 PS-*b*-PEO

Poli (estireno-*b*-óxido de etileno) (Figura 3.7) é um copolímero em bloco anfifílico que apresenta forte força de segregação entre seu bloco hidrofóbico (PS) e seu bloco hidrofílico (PEO), sendo um dos sistemas mais estudados, por ser considerado útil no encapsulamento de fármacos hidrofóbicos em suspensão (YU; EISENBERG, 1996; WANG *et al.*, 2011; GLAGOLA *et al.*, 2012).

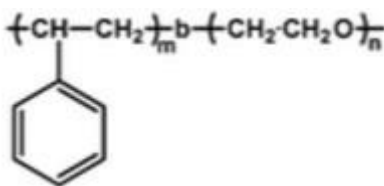


Figura 3.7 - Representação da estrutura química do copolímero em bloco PS-*b*-PEO. Fonte: WU *et al.*, 2011.

O poli(óxido de etileno) (PEO) é um polímero cuja estrutura consiste de uma cadeia linear composta por átomos de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), que apresenta solubilidade em água e também em solventes orgânicos (ALI *et al.*, 2016). Também conhecido como polietileno glicol (PEG), quando se apresenta com baixo peso molecular, seu uso tem sido aprovado para diversas aplicações médicas, já que se mostra um biomaterial com excelente biocompatibilidade devido à sua flexibilidade, seu caráter hidrofílico, que auxilia na estabilização das vesículas, e também à sua atoxicidade. Devido à sua compatibilidade com células, o PEO tem sido utilizado no desenvolvimento de órgãos artificiais, além de dispositivos médicos de alto desempenho, como suportes para engenharia de tecidos e matrizes para sistemas de liberação de fármaco (KUMAR; RAVIKUMAR; DOMB, 2001; LOGAN, 2005).

O poliestireno (PS) é normalmente utilizado na composição dos núcleos de sistemas nanoparticulados aplicados na liberação de fármacos, devido à sua alta estabilidade

(MUDSHINGE *et al.*, 2011). Nos últimos anos diversos trabalhos foram desenvolvidos buscando avaliar a resposta celular ao poliestireno, seja na porção hidrofóbica de copolímeros anfifílicos ou como único componente de NP's que atuam como carreadores de fármacos. CHANG (2012) realizou a síntese de NP's utilizando o copolímero dibloco poli(etileno glicol metil éter metacrilato-*b*-estireno) (PEGMEMA-*b*-PS) e o copolímero tribloco PEGMEMA-PS-S-S-PS-PEGMEMA, e assim estudou sua interação com células cancerígenas e a capacidade de serem absorvidas pelas células. Foi realizado teste citotóxico com as NP's em três concentrações distintas, 50, 100 e 150µg/mL, mostrando que não houve toxicidade às células em nenhuma das concentrações analisadas. Através dos testes realizados para avaliar a absorção celular concluiu-se que o tamanho e a forma das NP's são parâmetros importantes que influenciam na capacidade de absorção, já que as NP's menores foram absorvidas mais rapidamente que as NP's maiores. Quanto à forma, as NP's com formato micelar foram absorvidas a um ritmo mais rápido, mas as NP's com formato de bastão também foram eventualmente absorvidas.

No trabalho desenvolvido por FIRDESSA *et. al.* (2014), foram utilizadas NP's de poliestireno a fim de avaliar mecanismos de captação e os fatores que afetam sua absorção em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), células epiteliais de rim e fibroblastos. Os resultados mostraram que a absorção das NP's ocorre principalmente por endocitose, e é um processo dependente de energia e também do tamanho das NP's, dos tipos de célula e do tempo. Embora as NP's de maior tamanho sejam normalmente absorvidas por fagocitose ou micropinocitose, os resultados obtidos sugerem que as NP's menores são internalizadas por múltiplas vias de endocitose. As partículas são internalizadas e acumulam-se nos compartimentos endossômicos. Foi também avaliada a toxicidade das NP's de poliestireno nas células utilizadas, e o resultado se mostrou satisfatório, já que as partículas não se mostraram tóxicas até mesmo em uma concentração 10 vezes maior do que a que foi utilizada.

### **3.3 Adapaleno**

O adapaleno (AD) é um fármaco derivado do ácido naftóico, integrante da terceira geração da família dos retinóides, cuja estrutura química, formada por anéis aromáticos

(Figura 3.8), promove uma maior estabilidade à sua molécula quando exposta à luz e ao oxigênio. O AD tem sido amplamente pesquisado, pois apresenta os mesmos benefícios terapêuticos de outros tipos de retinóides, mas com redução das reações adversas usuais dos retinóides, tais como ressecamento, eritema, descamação e irritação. Adicionalmente, uma ação anti-inflamatória mais pronunciada é observada (CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001; CUNLIFFE; HOLLAND; JEREMY, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

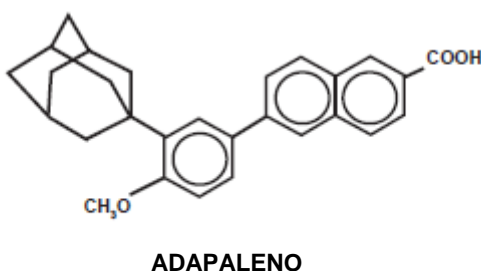


Figura 3.8 - Estrutura química do Adapaleno. Fonte: MUKHERJEE *et al.*, 2006.

Assim como os demais retinóides, o adapaleno é capaz de atuar em uma grande variedade de processos celulares, principalmente no crescimento e diferenciação das células. Essa ação é mediada por receptores de ácido retinóico RAR $\gamma$  e RAR $\beta$ , que estão localizados principalmente na epiderme e na derme, respectivamente. Através desses receptores o adapaleno promove a descamação anormal da pele, a modulação da diferenciação celular e também apresenta propriedades anti-inflamatórias (SHROOT; MICHEL, 1997; RIGOPOULOS *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2006). Por possuir essa capacidade característica dos retinóides de atuar sobre os processos celulares, acrescida pela minimização dos efeitos colaterais e sua ação anti-inflamatória, o AD tem sido utilizado principalmente no tratamento anti-acne, atuando na reversão da descamação folicular anormal e no processo de resposta inflamatória envolvidos nesta patogênese, através da normalização do processo de diferenciação das células epiteliais foliculares, diminuindo assim a formação de comedões (KAWASHIMA *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2014). Além das aplicações no combate à acne, outros estudos envolvendo o uso do AD têm sido desenvolvidos, seja no tratamento contra o câncer (OCKER *et al.*, 2003, 2004; LIN, 2014), na dermatologia, com aplicações cosméticas para tratamento anti-idade e doenças de pele (ALTINYAZAR *et al.*, 2005; HERANE *et*

*al.*, 2012) ou no tratamento de lesões na pele (BASAK *et al.*, 2002).

Com relação ao tratamento de feridas, em diferentes estudos e condições, a aplicação tópica de retinóides tem se mostrado benéfica, propiciando a proliferação de fibroblastos dérmicos, a redução da expressão de várias MMP e a produção de colágeno (BAŞAK *et al.*, 2002; LATEEF *et al.*, 2005; TOM *et al.*, 2005; DE CAMPOS PESETO *et al.*, 2016). Benefícios relacionados à minimização da formação de cicatrizes também são descritos na literatura para o ácido retinóico, mas não para o adapaleno (AUST *et al.*, 2010; DEMATTE *et al.*, 2011; TAHERI *et al.*, 2015).

### **3.4 Filmes de Colágeno e Gelatina como Curativos para Lesões por Queimadura**

O colágeno é um polímero natural que consiste em, aproximadamente, 30% de toda a proteína presente no corpo de um vertebrado, integrando mais de 90% da proteína extracelular presente no tendão e no osso, e mais de 50% da pele. Esta proteína possui elevada homologia entre espécies, sendo os bovinos e os suínos fontes acessíveis de colágeno tipo I, que é o mais conhecido, devido a suas fibrilas serem as mais abundantes e amplamente distribuídas no organismo (FRIESS, 1998; RUSZCZAK, 2003). A estrutura molecular do colágeno tipo I é composta por 3 cadeias de polipeptídeos formando uma tripla hélice (Figura 3.9). Estas cadeias polipeptídicas são caracterizadas pela presença de uma repetição de aminoácidos, sendo que todo terceiro aminoácido é a glicina (Gly), resultando em uma sequência XxxYyyGly, onde Xxx e Yyy podem ser compostos por qualquer aminoácido, sendo a Prolina (Pro) e a Hydroxiprolina (Hyp) os tipos mais comuns, que ocupam essas posições em 28% e 38% das vezes, respectivamente. Estas estruturas tripla hélice são conhecidas como Tropocolágeno (TC), e quando interagem entre si formam fibras e redes que integram a pele, ossos e membranas basais (PURNA; BABU, 2000; SHOULDERS; RAINES, 2010).

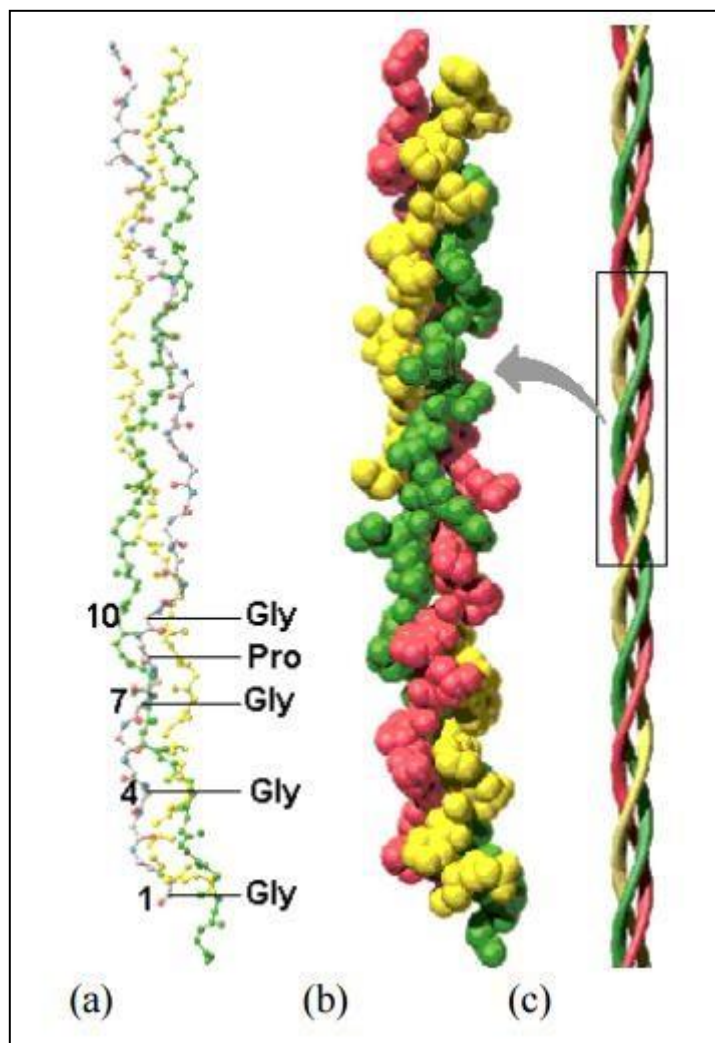


Figura 3.9 - Estrutura do Colágeno: a) Sequência primária de aminoácidos; b) Tropocolágeno; e c) Estrutura tripla hélice. Fonte: VULCANI, 2004.

A gelatina é um material obtido pela degradação parcial do colágeno, que apresenta baixo custo e ótimas propriedades funcionais e filmogênicas, já que suas cadeias possuem grande habilidade de ligação com moléculas de água, apresentando assim a vantagem de absorver exsudatos (no caso de aplicações envolvendo curativos). Esse polímero é capaz de promover e acelerar o processo de granulação e epitelização, e também a coagulação sanguínea (WANG *et al.*, 2012b; NUNES *et al.*, 2016; TUMMALAPALLI *et al.*, 2016).

O uso do colágeno e da gelatina como curativo para feridas apresenta muitas vantagens, pois se tratam de materiais que apresentam biocompatibilidade com a

maioria dos tecidos endógenos e também baixa antigenicidade, além de gerar curativos que são considerados práticos e facilmente remodelados, características essas provenientes de sua estrutura simples e relativamente uniforme (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014). Sua natureza hidrofílica acrescida de sua estrutura molecular e a capacidade de serem absorvidos e degradados tornam-os atrativos para vários tipos de células, oferecendo suporte para a adesão celular e guiando/estimulando a formação tecidual, uma vez que nutrem as células que preenchem o tecido afetado e permitem o acesso de células de defesa ao local da lesão, permitindo adesão, migração e proliferação celular (PURNA; BABU, 2000; NUNES, 2013). Outra vantagem apresentada pelo uso desses biopolímeros como curativo é sua capacidade de atuar como sistema de liberação controlada de fármacos e demais agentes ativos, o que permite que sua ação na lesão seja associada à ação de agentes antibióticos, anti-inflamatórios, potencializadores do processo de renovação celular, entre outros. Além disso, trata-se de um sistema cujo objetivo é que ocorra sua degradação total no período de liberação do ingrediente ativo, tornando desnecessária a sua remoção (FRIESS, 1998; GIL, 2013).

Assim, esses hidrogéis têm sido recomendados como uma ótima opção para o tratamento tópico de queimaduras de segundo grau (EDWARDS, 2010; SHAN *et al.*, 2015; YOSHINO *et al.*, 2016).



## Capítulo 4: Métodos

### 4.1 Materiais Utilizados

Copolímero em bloco poli(estireno-*b*-óxido de estireno) (PS<sub>298</sub>-*b*-PEO<sub>134</sub>) cuja massa molar numérica média ( $M_n$ ) é 37.000g/mol e o índice de polidispersão (IP) 1,04, foi cedido gentilmente pelo grupo do Prof. Ulrich Wiesner (Cornell University); Adapaleno (Glenmark, Índia); Solvente 1,4-Dioxano (Synth); Colágeno tipo I, extraído de resíduos de couro *wet blue*, cedido pelo Prof. Luiz do Departamento de Química; Ácido Acético (CH<sub>3</sub>COOH) (Synth); Glicerina (Synth); Sulfadiazina de Prata (Sigma Aldrich); Gelatina (Sigma Aldrich); Propilenoglicol (Synth).

### 4.2 Síntese das Vesículas Poliméricas (VP's)

Para a síntese das VP's foram utilizados os procedimentos descritos por MA e EISENBERG (2009) e CAON *et al.* (2013) com adaptações.

Síntese das Vesículas Vazias:

Para a síntese das vesículas vazias 10mg do copolímero PS<sub>460</sub>-*b*-PEO<sub>230</sub> foram dissolvidos em 2mL de 1,4-dioxano, que é um solvente comum para ambos os blocos, sendo mantido sob agitação constante e temperatura ambiente até sua completa solubilização. Em seguida, ainda sob agitação magnética constante, foi adicionado 1,0mL de água Milli-Q® de forma lenta e gradativa em uma taxa de no máximo 250µL/h. Ao fim deste processo foram adicionados à suspensão mais 20mL de água ultrapura a fim de inibir a cinética de agregação das nanopartículas. Para a remoção do dioxano foi utilizado um rotoevaporador onde a suspensão obtida foi submetida à baixa pressão até a obtenção de um volume final de 10mL, que foi filtrado utilizando um filtro de acetato de celulose com poros de 4µm.

Síntese das Vesículas Carregadas com Adapaleno:

Para a síntese das vesículas carregadas 10mg do copolímero PS<sub>460</sub>-*b*-PEO<sub>230</sub> e 1mg de AD foram dissolvidos em 2mL de 1,4-dioxano, que é um solvente comum para ambos os blocos e também para o adapaleno, sendo mantido sob agitação constante e temperatura ambiente até sua completa solubilização. Em seguida, ainda sob agitação magnética constante, foi adicionado 1,0mL de água Milli-Q<sup>®</sup> de forma lenta e gradativa em uma taxa de no máximo 250µL/h. Ao fim deste processo, foram adicionados à suspensão mais 20mL de água ultrapura a fim de inibir a cinética de agregação das nanopartículas. Para a remoção do dioxano foi utilizado um rotoevaporador onde a suspensão obtida foi submetida à baixa pressão até a obtenção de um volume final de 10mL, que foi filtrado utilizando um filtro de acetato de celulose com poros de 4µm.

### 4.3 Filmes de Colágeno

#### 4.3.1 Preparo da Solução de Colágeno

O colágeno foi solubilizado em uma solução de ácido acético 3% (v/v) na concentração de 3% m/v. A solução foi mantida por duas horas à temperatura de 70°C, mediante agitação constante. Decorrido esse tempo foi realizada uma filtração a vácuo para remoção de possíveis impurezas provenientes do colágeno.

#### 4.3.2 Determinação da Concentração de Colágeno na Solução

Um volume de 5mL da solução obtida no item 4.3.1 foi vertido em uma placa de petri e mantido na estufa a 60°C por um período de 24 horas. Após a total evaporação do solvente formou-se um filme de colágeno, o mesmo foi pesado e, através da equação (4.1) foi possível determinar-se a concentração de colágeno na solução. A determinação da concentração de colágeno foi realizada em triplicata. O valor da concentração de colágeno na solução corresponde à média das três medidas.

$$\text{Concentração (m/v)} = \frac{\text{Massa do filme (g)}}{5\text{mL de solução}} \quad (4.1)$$

### **4.3.3 Preparo dos Filmes de Colágeno**

Os filmes de colágeno foram preparados seguindo a técnica de Casting, que se baseia na evaporação do solvente utilizado, nesse caso, a solução de ácido acético.

Foram preparados os seguintes filmes:

1. Filmes de colágeno puro;
2. Filmes de colágeno contendo sulfadiazina de prata na concentração 0,5% (m/m) em relação à massa de colágeno;
3. Filmes de colágeno contendo vesículas poliméricas carregadas com AD na concentração 0,0001% (m/m) de fármaco, mais 0,5% (m/m) de sulfadiazina de prata;
4. Filmes de colágeno contendo AD livre na concentração 0,01% (m/m).

Para o preparo dos filmes de colágeno foi utilizado um volume da solução contendo uma massa total de 1g de colágeno.

As soluções preparadas foram vertidas em moldes de polipropileno que foram mantidas em estufa a uma temperatura próxima a 50°C até a completa evaporação do solvente e formação dos filmes.

## **4.4 Filmes de Gelatina**

Foram preparados filmes de gelatina pura, filmes de gelatina contendo sulfadiazina de prata, filmes de gelatina contendo sulfadiazina de prata e vesículas carregadas com AD, e filmes de gelatina contendo AD livre.

### **4.4.1 Filmes de Gelatina Pura**

Foram utilizados 20% (m/m) de gelatina, em relação à massa total do filme de gelatina, 10% (m/m) de glicerina, 20% (m/m) de propilenoglicol e 50% (m/m) de água Milli-Q®.

### **4.4.2 Filmes de Gelatina contendo Sulfadiazina de Prata**

Foram utilizados 20% (m/m) de gelatina, 10% (m/m) de glicerina, 20% (m/m) de propilenoglicol, 0,05% (m/m) de sulfadiazina de prata e 50% (m/m) de água Milli-Q<sup>®</sup>.

#### **4.4.3 Filmes de Gelatina contendo Sulfadiazina de Prata e Vesículas Poliméricas carregadas com Adapaleno**

Foram utilizados 20% (m/m) de gelatina, 10% (m/m) de glicerina, 20% (m/m) de propilenoglicol, 0,05% (m/m) de sulfadiazina de prata e 50% (m/m) de dispersão de vesículas carregadas com AD.

#### **4.4.4 Filmes de Gelatina contendo Adapaleno**

Foram utilizados 20% (m/m) de gelatina, 10% (m/m) de glicerina, 20% (m/m) de propilenoglicol, 0,001% de AD livre e 50% (m/m) de solução de vesículas carregadas com AD.

Para o preparo da solução, primeiro a gelatina foi levigada na glicerina a fim de se realizar um umedecimento do pó. Em seguida foi adicionado o propilenoglicol (seja ele puro ou já contendo o fármaco disperso para as amostras carregadas) e a solução aquosa. A solução foi mantida sob agitação constante e sob aquecimento a 40°C *overnight* para completa solubilização da gelatina. Após a completa solubilização da gelatina a solução foi vertida em placa de petri de vidro e mantida em temperatura ambiente para completa gelificação. A amostra foi mantida em geladeira para conservação do material.

### **4.5 Determinação da concentração do AD por espectrofotometria na região do UV**

O método selecionado para a determinação da concentração do AD nas vesículas e nos estudos de liberação foi por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) utilizando o comprimento de onda de 320nm e espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2600.

#### 4.5.1 Avaliação da seletividade

A seletividade do método para quantificação do AD nas VP's foi avaliada verificando-se a ausência de absorvância para as VP's sem adição de AD no mesmo comprimento de onda  $\lambda = 320\text{nm}$ .

Para a análise da seletividade, foram pesados 2,5g das VP's sem adição de AD em um balão volumétrico de 10mL. As VP's foram diluídas com 4mL de THF e homogeneizadas até solubilização completa das VP's. Após a solubilização completa do sistema, o volume foi completado com metanol e a solução homogeneizada, levando à precipitação da matriz polimérica. A dispersão foi centrifugada a 4000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi analisado no UV-Vis em comprimento de onda  $\lambda = 320\text{nm}$ . Foi utilizada uma solução de metanol/THF 60:40 m/m como branco.

#### 4.5.2 Linearidade da curva analítica para determinação do AD nas vesículas poliméricas

Para a verificação da relação dose resposta do método analítico desenvolvido, foram construídas três curvas analíticas para quantificação do AD. As curvas analíticas foram preparadas a partir de uma solução estoque obtida através da pesagem quantitativa de 5,0mg de AD em um balão volumétrico de 50mL, sendo o volume completado com THF e o AD foi cuidadosamente solubilizado (AD 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A partir desta solução foram transferidos, utilizando pipetas volumétricas, os volumes de 1mL, 2mL e 4mL para balões volumétricos de 10mL. A esses balões foi adicionado 4mL de THF e o volume completado com metanol. As soluções obtidas foram homogeneizadas, obtendo-se soluções com as seguintes concentrações: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AD. Da solução 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram pipetados 5mL, utilizando pipeta volumétrica, e transferidos para um balão volumétrico de 10mL. A este balão também foram adicionados 4mL de THF. O volume foi completado com metanol e a solução homogeneizada (AD 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Desta solução foram pipetados 5mL, utilizando pipeta volumétrica, que foram transferidos para um balão de 10mL. Na sequência foram adicionados 4mL de THF, o volume completado com metanol e a solução homogeneizada (AD 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Da solução contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi pipetado ainda 1mL, utilizando pipeta volumétrica, que foi transferido para um balão de 10mL, onde foram adicionados 4mL de THF. O volume foi completado com metanol e a solução

homogeneizada (AD 1 $\mu$ g/mL). Em seguida, foram realizadas leituras no espectrofotômetro no comprimento de onda  $\lambda= 320\text{nm}$ . Uma solução metanol/THF 60:40 m/m foi utilizada como branco.

#### **4.5.3 Linearidade da curva analítica para determinação do AD nos ensaios de liberação *in vitro***

Uma vez que o AD é praticamente insolúvel em água ('USP - *Revision Bulletin Oficial*', 2012), um meio de liberação consistindo de solução tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4:Etanol (70:30) (Tabela 4.2) contendo 2% de monooleato de sorbitanoetoxilado 60 (Tween 60) foi usado para atender as condições *sink* (CAON *et al.*, 2013). Assim, para determinação da concentração do AD nesse meio, uma nova avaliação da linearidade foi realizada.

Foram obtidas três curvas analíticas do AD a partir da solução estoque (100 $\mu$ g/mL) descrita no Tópico 4.5.2. A Tabela 4.1 apresenta as alíquotas e condições de diluição utilizadas para o preparo das soluções contendo as diferentes concentrações de AD que foram utilizadas para a obtenção da curva analítica. Para todas as soluções finais, o volume dos balões volumétricos foi completado com solução tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4:Etanol (70:30) (Tabela 4.2) contendo 2% de monooleato de sorbitanoetoxilado 60 (Tween 60), sendo a solução homogeneizada. Após o preparo destas soluções, foram realizadas leituras por espectroscopia UV-Vis no comprimento de onda  $\lambda=320\text{nm}$ , utilizando a solução tampão utilizada na diluição como branco.

**Tabela 4.1** - Concentrações utilizadas para montagem da Curva Analítica do Adapaleno em Solução Tampão PBS.

<b>Alíquotas e Solução Utilizadas</b>	<b>Balão Volumétrico Utilizado</b>	<b>Concentração Final</b>
2,0mL – solução 100µg/mL	10mL	20µg/mL
1,0mL – solução 100µg/mL	10mL	10µg/mL
2,0mL – solução 20µg/mL	5mL	8µg/mL
1,0mL – solução 100µg/mL	25mL	4µg/mL
1,0mL – solução 20µg/mL	10mL	2µg/mL
1,0mL – solução 10µg/mL	10mL	1µg/mL
1,0mL – solução 20µg/mL	25mL	0,8µg/mL
1,0mL – solução 10µg/mL	25mL	0,4µg/mL

\*Todas as alíquotas foram obtidas utilizando pipetas volumétricas.

**Tabela 4.2** - Composição da solução tampão PBS pH 7,4.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (g)</b>
Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,38
Fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,19
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )	8,00
Água Destilada	q.s.p. 1000 mL

#### 4.5.4 Linearidade da curva analítica para determinação da SSD nos ensaios de liberação *in vitro*

Para a avaliação da linearidade para adequada quantificação da SSD nos ensaios de liberação foram obtidas três curvas analíticas a partir de uma solução estoque de SSD na concentração de 500µg/mL. A solução estoque foi obtida a partir da solubilização de 25,0mg do fármaco, com o auxílio de um balão volumétrico de 50mL, cujo volume foi completado com o ácido clorídrico 3mol/L. A Tabela 4.3 apresenta as alíquotas utilizadas para o preparo das soluções contendo as diferentes concentrações de SSD que foram analisadas para a obtenção da curva analítica, bem como a capacidade dos balões volumétricos para os quais as alíquotas foram transferidas e as concentrações obtidas. O volume dos balões volumétricos foi completado com solução tampão fosfato

salina (PBS) pH 7,4:Etanol (70:30) contendo 2% de monooleato de sorbitanoetoxilado 60 (Tween 60), sendo a solução homogeneizada. Após o preparo destas soluções, foram realizadas leituras por espectroscopia UV-Vis no comprimento de onda  $\lambda=261\text{nm}$ , utilizando a mesma solução tampão como branco.

**Tabela 4.3** - Concentrações utilizadas para montagem da Curva Analítica da Sulfadiazina de Prata em Solução Tampão PBS.

<b>Alíquotas e Solução Utilizadas</b>	<b>Balão Volumétrico Utilizado</b>	<b>Concentração Final</b>
4,0mL – solução 500 $\mu\text{g/mL}$	10mL	200 $\mu\text{g/mL}$
2,0mL – solução 500 $\mu\text{g/mL}$		100 $\mu\text{g/mL}$
1,0mL – solução 500 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$
5,0mL – solução 50 $\mu\text{g/mL}$		25 $\mu\text{g/mL}$
5,0mL – solução 25 $\mu\text{g/mL}$		12,5 $\mu\text{g/mL}$
5,0mL – solução 12,5 $\mu\text{g/mL}$		6,25 $\mu\text{g/mL}$

#### 4.5.5 Análise estatística

Para verificação da linearidade das curvas obtidas para quantificação do AD nas vesículas e nos estudos de liberação *in vitro*, bem como para quantificação da SSD nos estudos de liberação *in vitro*, é necessária a análise de regressão linear. Assim, para a adequação das curvas obtidas ao modelo de regressão linear todas as premissas obrigatórias foram avaliadas utilizando o programa GraphPadPrism<sup>®</sup> 5. A normalidade dos dados brutos e resíduos foi avaliada através do teste de Kolmogorov- Smirnov.e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett, ambos a um nível de significância de 0,05. A ausência de correlação dos erros também foi verificada, bem como avaliação da equivalência dos interceptos e inclinação das 3 curvas obtidas, sendo então possível obter um equação da reta e um coeficiente de determinação único a partir das 3 curvas.

#### 4.5.6 Limite de detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração de analito que pode ser detectada em uma amostra, entretanto, não necessariamente detectada. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração de analito que pode ser



determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O cálculo desses valores foi realizado seguindo a RE nº899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, utilizando-se as equações (4.1) e (4.2), onde  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das 3 curvas e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (4.1)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (4.2)$$

## 4.6 Caracterização

### 4.6.1 Caracterização morfológica das vesículas produzidas com copolímero em bloco por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A morfologia das vesículas vazias e carregadas com o AD foi observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) através do uso de um microscópio Tecnai G2-12 – SpiritBiotwin FEI – 120kV, equipado com câmera CCD e operado a uma voltagem de aceleração de 80kV, presente no Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram preparadas através da diluição de 50 $\mu$ L da suspensão em 1mL de água ultrapura, sendo 100 $\mu$ L dessa solução depositada sobre grades Lacey Carbon que são revestidas por uma fina camada de carbono e recebem tratamento para tornar suas superfícies hidrofílicas. Após a deposição da solução as grades foram secas em temperatura ambiente para futura visualização.

### 4.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A caracterização da distribuição dos tamanhos das vesículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) através dos equipamentos Zetasizer Nanoseries Nano-Zs90, Malvern Instruments, presente no Departamento de Produtos

Farmacêuticos da FAFAR e do ZetaPALS, da Brookhaven Instruments presente no LEPCOM. A técnica foi empregada para a caracterização das amostras de VP's de PS-*b*-PEO vazias e contendo AD. Para a análise foram utilizados 2,0mL de cada amostra previamente diluída a uma proporção de 50 $\mu$ L de solução para cada 1mL de água Milli-Q<sup>®</sup>, utilizando cubetas cilíndricas a uma temperatura constante de 25°C, ângulo de 90°, durante 300s.

#### **4.6.3 Potencial Zeta**

Através dos equipamentos Zetasizer Nano-Zs90 e do ZetaPALS, foi realizada também a análise do potencial de superfície ou potencial zeta, onde foi utilizado 1,0mL de cada amostra previamente diluída, bem como foi utilizado para a análise por DLS, a uma temperatura de 25°C, em cubeta específica.

#### **4.6.4 Avaliação da Presença de Solvente por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR**

A espectroscopia de infravermelho é um método físico para análise que é utilizado no estudo das moléculas orgânicas e compostos inorgânicos, podendo ser aplicado em biomateriais, polímeros, entre outros materiais (MANSUR, 2012). A avaliação da presença de dioxano na formulação preparada foi realizada no espectrômetro Thermo Scientific Nicolet 6700. O espectro do FTIR de reflectância total atenuada na região de 650-4000 $\text{cm}^{-1}$  foi obtido no modo de absorbância com uma resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ . Foram registradas 32 varreduras por amostra, que foram colocadas sobre cristais Multi-Bounce de ZnSe. Foram analisadas amostras de 1,4-dioxano e também as soluções contendo VP's de PS-*b*-PEO vazias e apresentando AD em seu interior.

#### **4.6.5 Termogravimetria (TG)**

Foi realizada análise termogravimétrica do copolímero em bloco PS-PEO, do Adapaleno e das vesículas carregadas com o AD, utilizando o equipamento EXSTAR TG/DTA 7200 do laboratório LEPCOM da UFMG. As amostras foram submetidas a uma atmosfera controlada de nitrogênio, com fluxo de 30mL/min e uma taxa de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de 30 a 600°C.

#### **4.6.6 Determinação do Teor de Encapsulação do Adapaleno nas vesículas poliméricas**

A avaliação do teor de encapsulação do AD foi realizada através da determinação da concentração do fármaco presente na formulação contendo as VP's antes da filtração e após a filtração utilizando papel filtro faixa branca, Unifil, com poros de 4 $\mu$ m de diâmetro, que é responsável por remover os cristais de AD não encapsulados.

A leitura das amostras foi realizada por espectroscopia de absorção de radiação na região ultravioleta-visível (UV-Vis) em um equipamento SHIMADZU UV 2600, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0cm.

- **Teor Total**

Para a determinação do teor total de AD, foram pesadas 2,5g da formulação em um balão volumétrico de 10mL. Na sequência, foram adicionados 4mL de THF para solubilização das VP's e do fármaco. Após solubilização completa do sistema, o volume foi completado com metanol e a solução foi homogeneizada, levando à precipitação da matriz polimérica, mas mantendo-se o fármaco solúvel. Na sequência, 5mL da dispersão foram centrifugados a 4000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi analisado no UV-Vis, em comprimento de onda  $\lambda = 320\text{nm}$ .

- **Teor Encapsulado**

Para a determinação do teor de AD encapsulado foram pesados 2,5g da formulação filtrada diretamente em um balão volumétrico de 10mL. Na sequência, foram adicionados 4mL de THF para solubilização das VP's e do fármaco. Após solubilização completa do sistema, o volume foi completado com metanol e homogeneizado, levando à precipitação da matriz polimérica, mas mantendo-se o fármaco solúvel. Em seguida, 5mL da dispersão foram centrifugados a 4000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi analisado no UV-Vis em comprimento de onda  $\lambda = 320\text{nm}$ .

#### **4.6.7 Análise da Presença de Cristais de Adapaleno por Microscopia de Luz Polarizada**

Para a análise da presença de cristais de AD na formulação pré e pós filtragem, foi utilizado o microscópio de luz polarizada de marca Zeiss Axio-Imager M2 com câmera Axio Cam ERc5s acoplada. Foi utilizada uma gota de cada solução (pré filtragem e pós filtragem), que foram dispostas sobre lâminas de vidro lisas para microscopia. As imagens geradas foram visualizadas e tratadas com auxílio do programa Axio Camer - Zen Pro 2012.

#### **4.6.8 Análise do pH de Superfície dos Filmes de Colágeno e Gelatina**

Para a avaliação do pH de superfície, os filmes de gelatina (com AD, com SSD e com vesículas contendo AD) e de colágeno (com AD, com SSD e com vesículas contendo AD) foram cortados com punch para biópsia de 8mm e em seguida foram umedecidos com 500µL de água. Em seguida, o pH da superfície molhada foi medido com fita indicadora de pH, pH-Fix 0-14 da Macherey-Nagel. A análise foi realizada em triplicata.

#### **4.6.9 Liberação *in Vitro***

Com o objetivo de garantir a condição *sink* ao longo do estudo de liberação, ou seja, longe da concentração de saturação, a solubilidade dos fármacos (AD e SSD) no meio de dissolução foi avaliada. Assim foram preparadas suspensões de AD e SSD a partir da adição de 50mg de cada fármaco em um frasco de penicilina contendo 7mL da solução tampão PBS:Etanol na proporção 70:30 acrescido de 2% de Tween 60, a mesma utilizada nos estudos de liberação *in vitro*. Os frascos foram vedados e mantidos sob agitação, com o auxílio de barras magnéticas, durante 24 horas a uma temperatura de 37°C, a mesma utilizada durante os ensaios. Decorridas 24 horas, foram coletadas amostras em triplicata dos frascos, que foram filtradas para remover os fármacos em suspensão, sendo os fármacos em solução quantificados conforme descrito nos Tópicos 4.5.3 e 4.5.4.

#### **4.6.10 Estudo de Liberação do Adapaleno pelas Vesículas Poliméricas**

Para a realização do ensaio de liberação do AD foi utilizado um sistema consistindo na

formulação contendo as VP's sintetizadas contendo o AD encapsulado, sendo utilizado 2mL da formulação.

O sistema foi colocado em saco de diálise (membrana de éster de celulose, diâmetro de 33mm – Sigma-Aldrich D9652-100FT; Estados Unidos). O saco de diálise foi colocado em frasco de penicilina âmbar contendo 5,0mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4:Etanol (70:30) contendo 2% de monooleato de sorbitanoetoxilado 60 (Tween 60). O frasco foi mantido na temperatura de 37°C, sob agitação constante com o auxílio de barra magnética. Nos seguintes tempos (1, 2, 4, 8 e 24 horas), 3mL do meio receptor foram retirados e a mesma alíquota da solução tampão foi adicionada para reposição. Foram realizadas leituras por espectroscopia UV-Vis no comprimento de onda  $\lambda = 320\text{nm}$ , utilizando a mesma solução tampão usada no ensaio como branco. O estudo foi realizado em triplicata.

#### **4.6.11 Ensaio de Liberação *in Vitro* dos Fármacos Adapaleno e Sulfadiazina de Prata pelos Filmes de Colágeno e Gelatina**

Nesta etapa foram realizados os ensaios de liberação a partir dos filmes de colágeno e gelatina contendo AD livre, SSD livre e a formulação contendo as vesículas carregadas.

Para avaliar a quantidade de fármaco liberada pelas amostras, os filmes foram cortados em discos de 20mm, utilizando-se *punch* para biópsia. Para o ensaio foram utilizados suportes de espumas de poliuretano, as quais mantiveram os filmes em contato com a solução tampão. As espumas foram inseridas em vidros onde foram adicionados 7mL de solução tampão PBS:Etanol na proporção 70:30 acrescido de mais 2% de Tween 60. As amostras foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 37°C, sendo retirada uma alíquota de 3mL a cada 30 minutos, até que se completasse 120 minutos de exposição dos filmes de gelatina e 150 minutos de exposição dos filmes de colágeno à solução. Para que o volume da solução se mantivesse constante, a cada 3mL de solução retirada do vidro, foram adicionados 3mL da solução na mesma temperatura de 37°C. As amostras foram analisadas em triplicata por UV-Vis nos comprimentos de onda  $\lambda = 320$  e  $261\text{nm}$ , para determinar a concentração do AD e da SSD, respectivamente.

#### 4.6.12 Cinética de liberação

Para avaliar o mecanismo de liberação do AD e da SSD, os dados experimentais foram ajustados a quatro modelos cinéticos. A equação do modelo de ordem zero (4.3) baseia-se na liberação lenta do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não desagregam. A equação do modelo de primeira ordem (4.4) descreve a liberação do fármaco de um sistema onde a taxa de liberação é dependente da concentração, podendo descrever a dissolução de fármacos solúveis em uma matriz porosa. A equação (4.5) do modelo de Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. A equação modelo de Hixson-Crowell (4.6) descreve a taxa de liberação como dependente da mudança na área superficial e no diâmetro das partículas (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; DASH *et al.*, 2010).

$$\text{Ordem zero: } Q_t = Q_0 + K_0t \quad (4.3)$$

$$\text{Primeira ordem: } \ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t \quad (4.4)$$

$$\text{Higuchi: } Q_t = K_h t^{1/2} \quad (4.5)$$

$$\text{Hixson-Crowell: } Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_3t \quad (4.6)$$

Onde:  $Q_t$  é a quantidade do fármaco liberado no tempo  $t$ ;  $Q_0$  é a quantidade do fármaco na solução no tempo zero e  $K$  é constante da cinética de liberação

O mecanismo de liberação dos fármacos também foi avaliado pelo modelo de Korsmeyer-Peppas ( $Q_t/Q_\infty = K_k t^n$ ; onde  $Q_t/Q_\infty$  é a fração do fármaco liberado). Neste modelo a constante cinética ( $K$ ) incorpora características estruturais e geométricas do sistema polimérico e o expoente de liberação ( $n$ ) caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco (Tabela 4.4). A aplicação desse modelo é limitada aos dados referentes a, no máximo, 60% da quantidade acumulada de fármaco liberado (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; DASH *et al.*, 2010).

**Tabela 4.4** - Interpretação do mecanismo de liberação por difusão a partir de filmes poliméricos.

<b>Expoente de liberação (n)</b>	<b>Mecanismo de transporte do fármaco</b>	<b>Taxa como uma função do tempo</b>
0,5	Difusão Fickiana	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anômolo	$t^{n-1}$
1,0	Transporte caso-II	Liberação de ordem zero
Maior do que 1,0	Transporte super caso-II	$t^{n-1}$

O critério para definição do melhor modelo de cinética de liberação das curvas de liberação obtidas para os diferentes modelos utilizados foi a avaliação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), sendo este o critério usualmente utilizado (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; LU; TEN HAGEN, 2017).

#### **4.6.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia dos filmes de colágeno foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) através do uso de um microscópio JEOL JSM – 6360LV, presente no Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro antes dos ensaios. Para obter imagens dos filmes produzidos, foram realizadas fraturas criogênicas nos materiais antes da análise por MEV.

## Capítulo 5: Resultados e Discussões

### 5.1 Preparação das VP's e Filmes de Gelatina e Colágeno

A síntese das VP's foi realizada através da técnica de cossolvente seguida de rotoevaporação para a remoção do solvente presente na solução. A técnica consistiu na dissolução do PS<sub>460</sub>-*b*-PEO<sub>230</sub> e do AD em 1,4-dioxano *overnight*, que foi seguida pela adição lenta de água Milli-Q<sup>®</sup>, que é responsável pela formação das estruturas através da autoassociação dos blocos copolímeros. Esse processo de auto- associação é interrompido pela adição de um excesso de água, que é seguido da rotoevaporação e da filtração. À medida que ocorre a adição da água na solução de dioxano e copolímero, vai aumentando a sua turbidez, resultando em uma solução de aspecto turvo, conforme mostra a Figura 5.1.



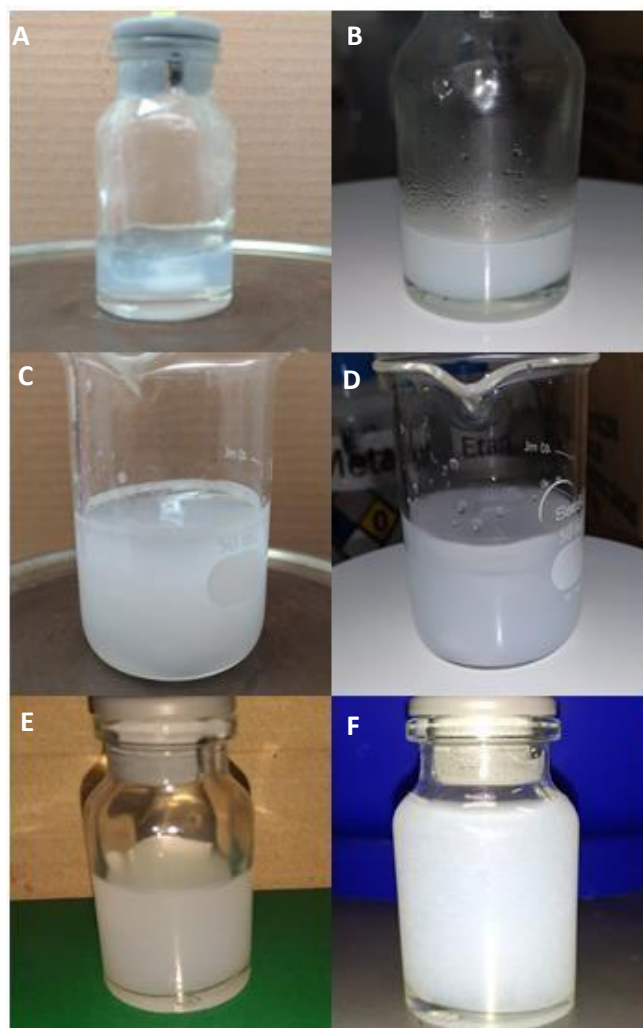


Figura 5.1 - Solução contendo  $PS_{460}$ - $b$ - $PEO_{230}$  e Adapaleno dissolvidos em 1,4-dioxano durante adição lenta de água (A) e (B); Dispersão após a adição do excesso de água (C) e (D); e Dispersão final obtida após a rotoevaporação e filtração (E) e (F).

Os filmes de gelatina (Figura 5.2) foram sintetizados utilizando propilenoglicol e glicerina, já os filmes de colágeno (Figura 5.3) foram sintetizados utilizando apenas a glicerina. O uso desses componentes buscou um aprimoramento das características dos filmes para aplicação como curativos, visando sua atuação como umectante, quando em contato com o ferimento, como plastificante, conferindo maior elasticidade e resistência aos filmes, permitindo sua manipulação sem que seja facilmente danificado, e como conservante, por apresentar atividade antibacteriana. O propilenoglicol foi utilizado ainda como solvente para os fármacos AD e SSD inseridos nos filmes, já que se mostra um melhor solvente que a glicerina (SWEETMAN, 2005).

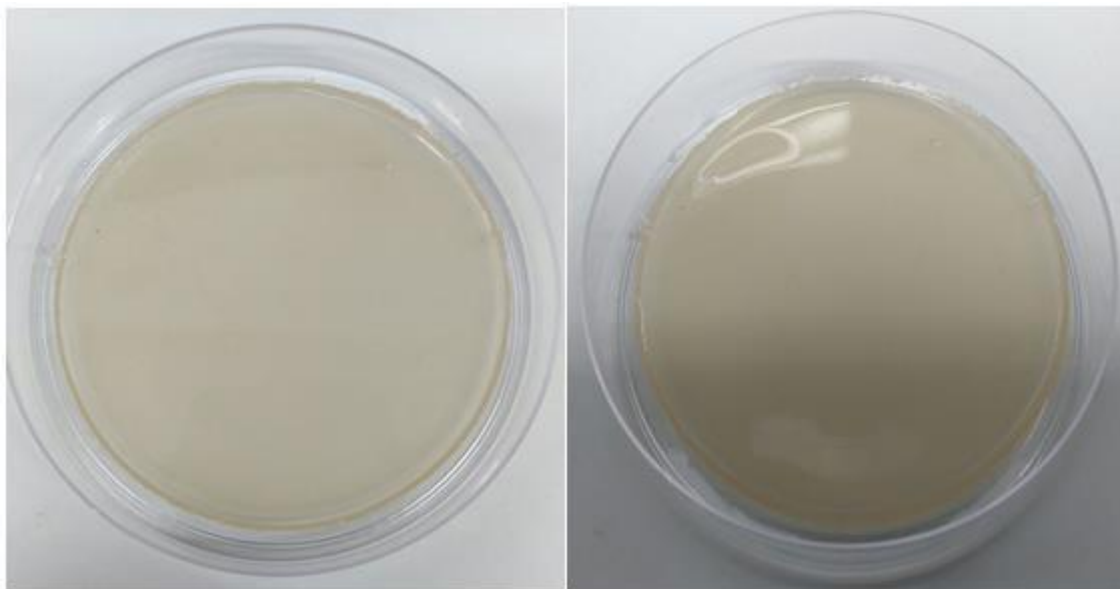


Figura 5.2 - Filmes de gelatina puro e contendo AD livre.



Figura 5.3 - Filmes de colágeno puro e contendo AD livre.

Os filmes de gelatina se mostraram flexíveis e íntegros, tanto para o filme contendo apenas a glicerina e o propilenoglicol quanto para os filmes contendo também os fármacos, apresentando-se resistentes quando manipulados. Entretanto os filmes contendo os fármacos perderam a transparência, devido à baixa solubilidade do AD e da SSD. Os filmes de colágeno contendo glicerina também se mostraram bem flexíveis, característica essa que não é observada nos filmes de colágeno puro, que se mostram

bem quebradiços. SHI *et al.*, 2017 investigaram a ação da glicerina em géis de poli(álcool vinílico) (PVA), através da mistura de PVA e glicerol em água, onde as moléculas de glicerol atuam como ponte conectando-se às cadeias de PVA formando ligações de hidrogênio. Esses géis apresentaram maior transparência, e também maior facilidade de gelificação à temperatura ambiente, conferindo-lhes excelentes propriedades como moldabilidade e termoplasticidade. A formação das ligações de hidrogênio, que conferem tais propriedades ao gel de PVA no trabalho supracitado, pode estar relacionada com as características apresentadas pelos filmes de gelatina e colágeno aqui sintetizados. Foi observado também que ao serem adicionados os fármacos AD e SSD, e a solução contendo as VP's aos filmes de gelatina e colágeno, os mesmos perderam a sua transparência.

As concentrações de AD utilizadas neste trabalho baseou-se no fato do fármaco ser liberado diretamente sob o tecido lesionado, sem a existência de barreiras, buscando evitar a ocorrência de irritação ou aumento da lesão e até mesmo toxicidade às células. Quanto à concentração da SSD, a mesma foi baseada no resultado apresentado por GIL *et al.* (2016), mostrando um bom resultado no estudo da atividade antimicrobiana.

## **5.2 Determinação do Teor de Encapsulação do Adapaleno nas Vesículas Poliméricas**

Foi construída uma curva analítica para a determinação quantitativa das amostras e a verificação da validade do método utilizado, usando-se como solução padrão uma solução de AD em THF na concentração de 100µg/mL. Para construção dos pontos da curva foram realizadas diluições a partir da solução padrão conforme foi detalhado na seção 4.4.5 obtendo uma faixa de concentração de 2,5 a 40,0µg/mL.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 0,35 e 1,16µg/mL, respectivamente, indicando que o método desenvolvido é suficientemente sensível para a quantificação do AD. O método também se mostrou seletivo para a quantificação do AD nas VP's, já que não houve leitura de absorbância para a análise realizada com as VP's sem adição do fármaco.

As premissas obrigatórias para adequação das curvas obtidas ao modelo de regressão linear foram verificadas, conforme descrito na seção 4.5. As análises para dados brutos e resíduos mostraram normalidade e homocedasticidade a um nível de significância de 0,05. Na análise de regressão linear, observou-se valores não significativos estatisticamente para o desvio de linearidade (aleatoriedade dos resíduos), confirmando-se a linearidade para as 3 curvas. As inclinações e interceptos para as 3 curvas foram comparados utilizando-se teste de F. Verificou-se que as inclinações não diferiram significativamente entre si, bem como os interceptos. Para ambos (inclinação e intercepto) obteve-se um p-valor muito superior a 0,05, não havendo evidência para rejeitar a hipótese nula. Desta forma foi possível obter uma equação da reta comum para as 3 curvas, cujo gráfico dos valores médios é apresentado na Figura 5.4, uma vez que elas são equivalentes:  $y = 0,0479x + 0,0581$ . O coeficiente de determinação obtido também foi adequado ( $r^2 = 0,9977$ ), indicando uma forte relação linear positiva entre as concentrações de AD em solução e a absorbância medida no equipamento, estando de acordo com o exigido pela RE 899 (ANVISA, 2003).

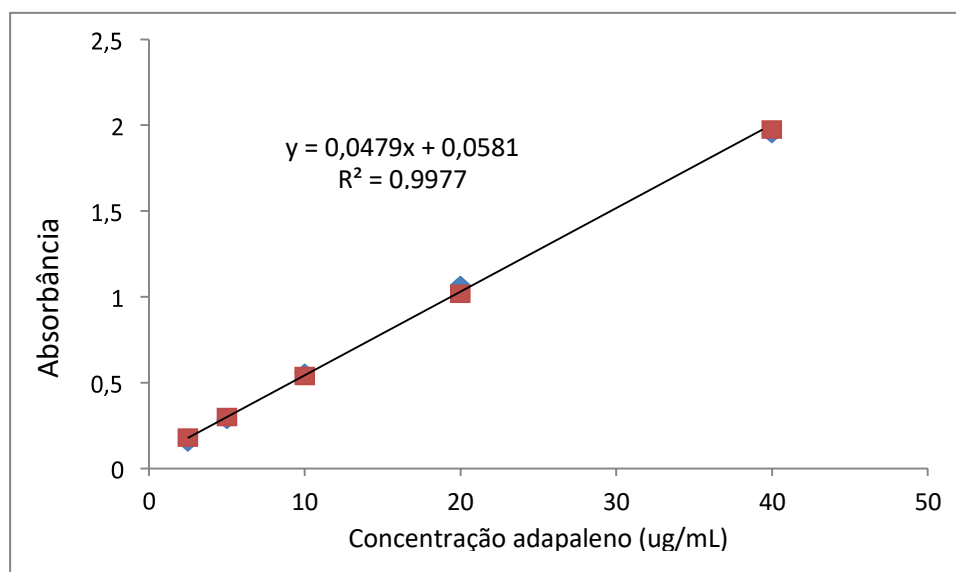


Figura 5.4 - Curva analítica para o Adapaleno em THF e Metanol realizado em UV-Vis.

### 5.3 Caracterização Morfológica das VP's

Foram realizadas análises das VP's preparadas a partir do copolímero em bloco PS-*b*-

PEO por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), possibilitando a observação de uma morfologia vesicular bem definida das NP's sintetizadas, conforme pode ser observado na Figura 5.5. Foi possível observar também que tais estruturas apresentam tamanhos inferiores a 200nm, o que foi confirmado através do uso do software ImageJ®, que foi empregado para se obter o diâmetro médio das vesículas presentes nas micrografias. Utilizou-se uma média de 100 medidas para se obter os valores médios de  $70,8 \pm 11,9\text{nm}$  para as NP's sem o fármaco e  $72,6 \pm 10,9\text{nm}$  para as NP's carregadas. As micrografias permitiram ainda obter a espessura da camada hidrofóbica das vesículas, devido ao ótimo contraste apresentado pelo copolímero, já que a densidade eletrônica do bloco hidrofóbico PS é maior que a do bloco hidrofílico PEO, que não pode ser visualizado nas imagens (DU; O'REILLY, 2009; MAI; EISENBERG, 2011). Os valores médios das espessuras das paredes das NP's obtidos foram  $23,4 \pm 2,8\text{nm}$  para as NP's sem o fármaco e  $24,1 \pm 3,4\text{nm}$  para as carregadas com o fármaco.

Assim como foi observado por CAON *et al.* (2013), por meio das micrografias, ao se comparar as VP's vazias com as carregadas com o AD, não é possível notar nenhuma alteração morfológica, com relação ao tamanho e formato das estruturas, que possa ter sido provocada pelo processo de encapsulação.

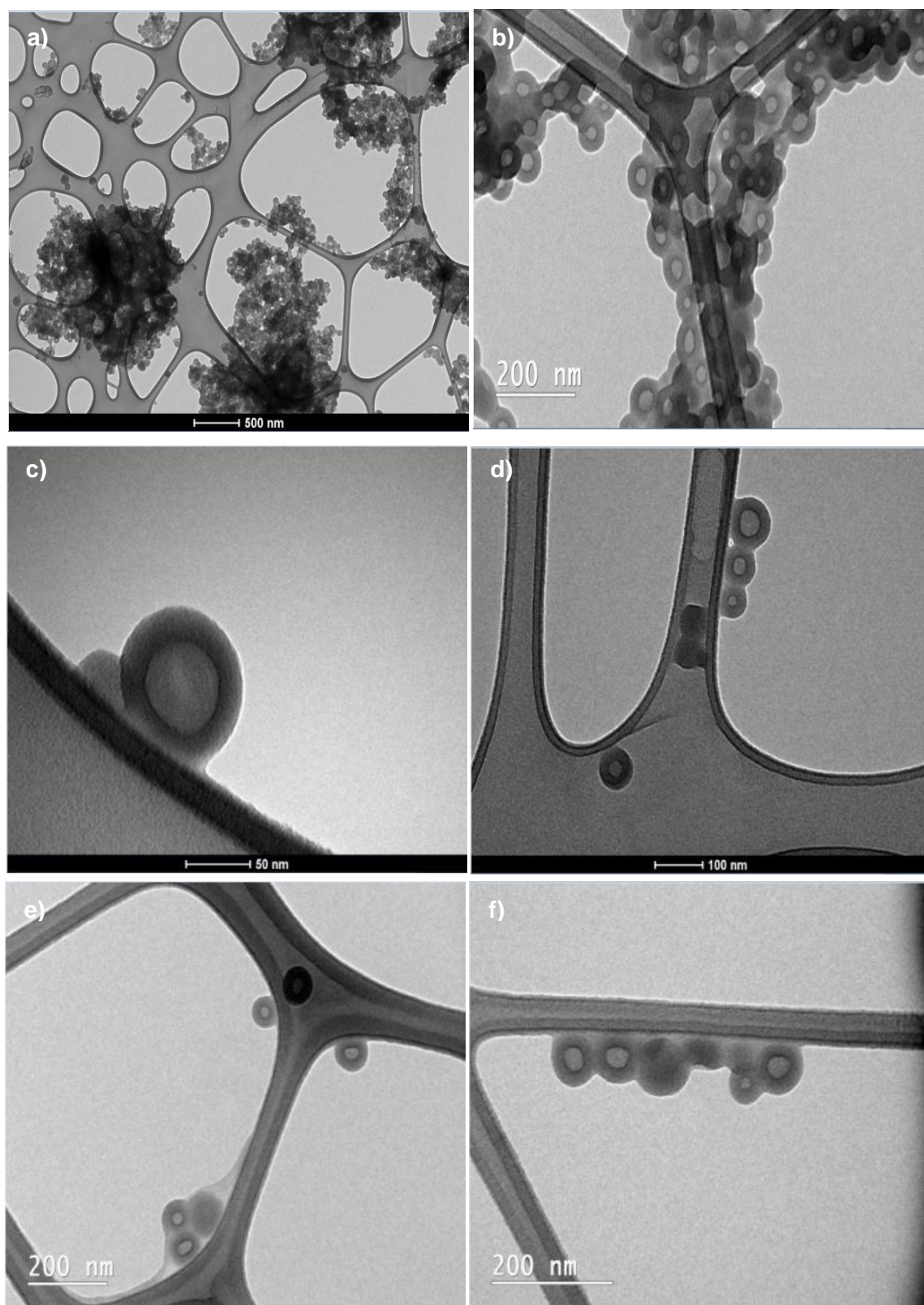


Figura 5.5 – Imagens de TEM das vesículas de PS-PEO: a, b e c correspondem às NP's sem o fármaco; d, e e f correspondem às NP's carregada com AD.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados da caracterização das VP's sem AD com relação ao diâmetro das NP's, o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta através da técnica DLS.

Tabela 5.1 - Resultado da caracterização das vesículas vazias por DLS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Formulação contendo VP's Vazias</b>
Diâmetro médio (nm)	436,3 ± 23,52
IP	0,358 ± 0,01
Potencial Zeta (mV)	14,21 ± 0,31

A Tabela 5.2 mostra os resultados da caracterização das VP's contendo AD com relação ao diâmetro das NP's, o IP, o potencial zeta, o teor total do AD presente na formulação antes de realizar a filtração e a eficiência de encapsulação do (EE).

Tabela 5.2 - Resultado da caracterização das vesículas carregadas com adapaleno por DLS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Formulação contendo VP's carregadas com AD</b>
Diâmetro médio (nm)	177,7 ± 12,54
IP	0,245 ± 0,02
Potencial Zeta (mV)	-17,93 ± 2,85
Teor total (%)	89,76
Eficiência de encapsulação (%)	9,00

Os valores médios dos diâmetros das VP's obtidos através das micrografias TEM mostram-se menores do que os valores obtidos através do DLS, entretanto, confirma que o tamanho médio das vesículas carregadas é menor que 200nm. Essa variação de tamanho pode ocorrer devido à desidratação causada pela evaporação da solução em que as VP's se encontram no processo de preparação das amostras para a análise por TEM e também pela condição de alto vácuo ao qual são submetidas neste equipamento. Segundo GIACOMELLI *et al.*, 2006 as diferenças entre os valores apresentados pelo TEM e pelo DLS são esperadas, já que um indica o diâmetro médio e o outro indica intensidade média do diâmetro, respectivamente. Os valores do IP presentes nas tabelas indicam que existe mais de um tamanho de nanopartícula em

suspensão, sendo que quanto maior for o seu valor, mais ampla será a distribuição de tamanho (SILVA, 2015). Já os valores de potencial zeta indicam que as formulações contendo as VP's, tanto vazias quanto carregadas com AD, apresentam estabilidade, já que a carga presente na superfície destas estruturas reduz a probabilidade de agregação. A mudança no valor da carga superficial das vesículas indica ainda a presença do AD em sua membrana. Devido à presença do fármaco durante o processo de autoassociação dos copolímeros para formação da nanoestrutura ocorre a dissociação do grupo carboxila do fármaco de COOH em COO<sup>-</sup> (FERREIRA, 2015).

O valor do teor total do fármaco presente na formulação após a síntese das VP's carregadas antes de passar pela etapa de filtração, mostrado na tabela, indica que 89,76% do fármaco inicialmente utilizado permaneceu no sistema, mostrando que há uma perda de 10,24% durante o processo de síntese das vesículas. Utilizando-se esse valor como referência, foi possível obter também o valor da eficiência do encapsulamento do AD pelas vesículas, mostrando que apenas 9,00% do fármaco foi encapsulado. Esse valor indica que a EE foi baixa, coincidindo com os resultados apresentados no trabalho publicado por RAMEZANLI *et al.*, 2017, que realizou a síntese de nanopartículas poliméricas derivadas de tirosina (denominadas TyroSpheres) contendo o Adapaleno encapsulado, obtendo uma taxa máxima de encapsulamento igual a 1,3%, que pode ser justificada pela rigidez apresentada pela estrutura do AD. Em outros trabalhos anteriormente publicados, a taxa de encapsulamento do adapaleno em sistemas nanoparticulados varia de 69 a 89% (JAIN *et al.*, 2014; HARDE *et al.*, 2015). Fazendo-se uma análise do processo de síntese das vesículas, do presente trabalho, esse baixo valor de encapsulamento obtido pode estar associado ao processo de filtração no qual é possível observar uma grande quantidade de material retido, que pode resultar na perda de uma alta concentração de vesículas carregadas, indicando que é necessária uma revisão e melhoria do protocolo adotado para a síntese.

#### **5.4 Avaliação da Presença de Solvente na Formulação por FTIR**

O 1,4-dioxano (Figura 5.6) é um éter cíclico muito utilizado na dissolução de copolímeros anfifílicos por apresentar a capacidade de solubilizar tanto polímeros hidrofílicos quanto hidrofóbicos, favorecendo a formação de estruturas vesiculares. A presença de resíduos



de solventes orgânicos, como este utilizado, em formulações para uso no organismo humano pode causar irritação, quando empregado em tratamentos tópicos, entre outras reações. Devido a isso, ao final do preparo das estruturas, é necessário realizar a sua eliminação. Neste trabalho procurou-se realizar através da rotoevaporação (MACY, 1976; SILVA, 2015). Para verificar se houve a eliminação do resíduo do solvente foi empregada a análise por FTIR. Para isso foram realizadas leituras a partir do solvente puro, que foi utilizado como padrão, e também de amostras das formulações contendo as VP's vazias e carregadas com AD.

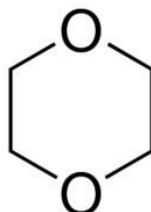


Figura 5.6 - Estrutura química do 1,4-dioxano. Fonte: Sigma Aldrich.

A Figura 5.7 apresenta os espectros de infravermelho para o solvente orgânico 1,4-dioxano e para as formulações contendo vesículas vazias e vesículas carregadas com adapaleno, obtidos no espectrômetro Thermo Scientific Nicolet 6700. O espectro do 1,4-dioxano mostra-se semelhante ao espectro de infravermelho apresentado pelo *NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY* - NIST, 2016 para o mesmo solvente. Nele é possível se observar bandas na faixa entre  $3020-2800\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação C-H. Também é possível observar bandas na faixa entre  $1117-1047\text{cm}^{-1}$  e a banda em  $875\text{cm}^{-1}$  que estão relacionadas à banda de estiramento assimétrico da ligação C-O característico dos éteres (BARBOSA, 2007).

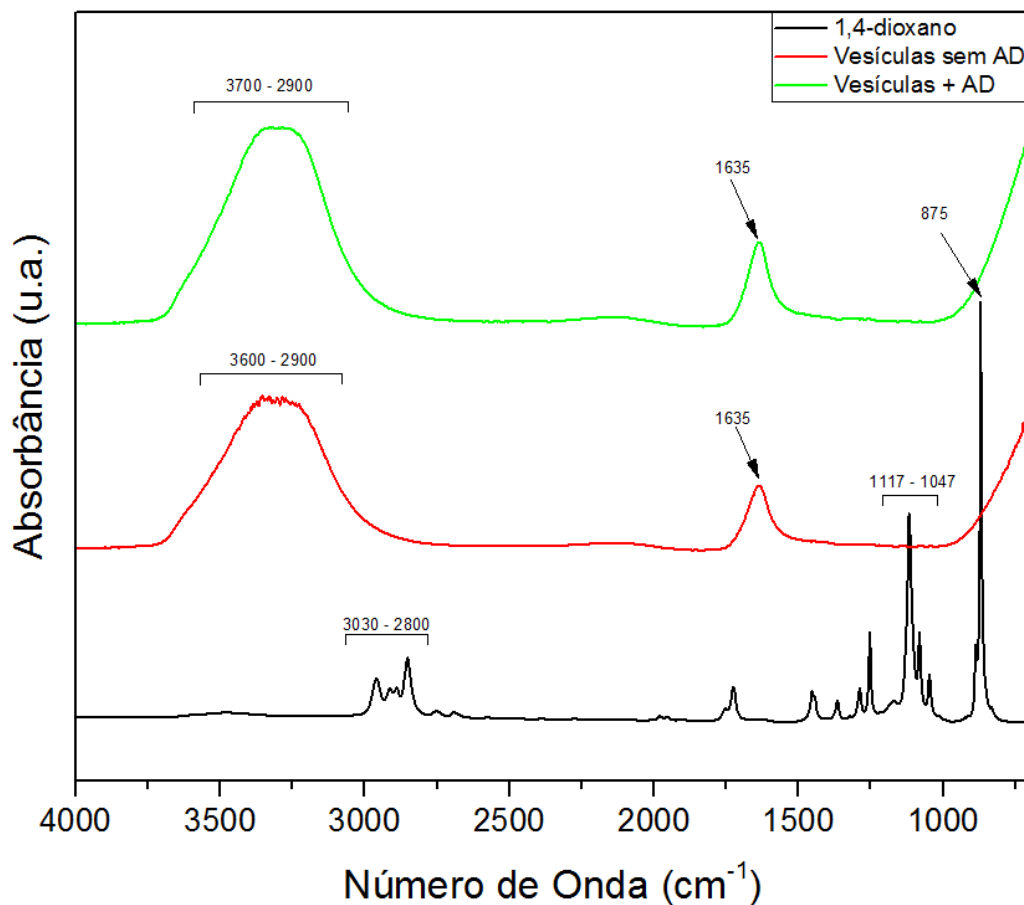


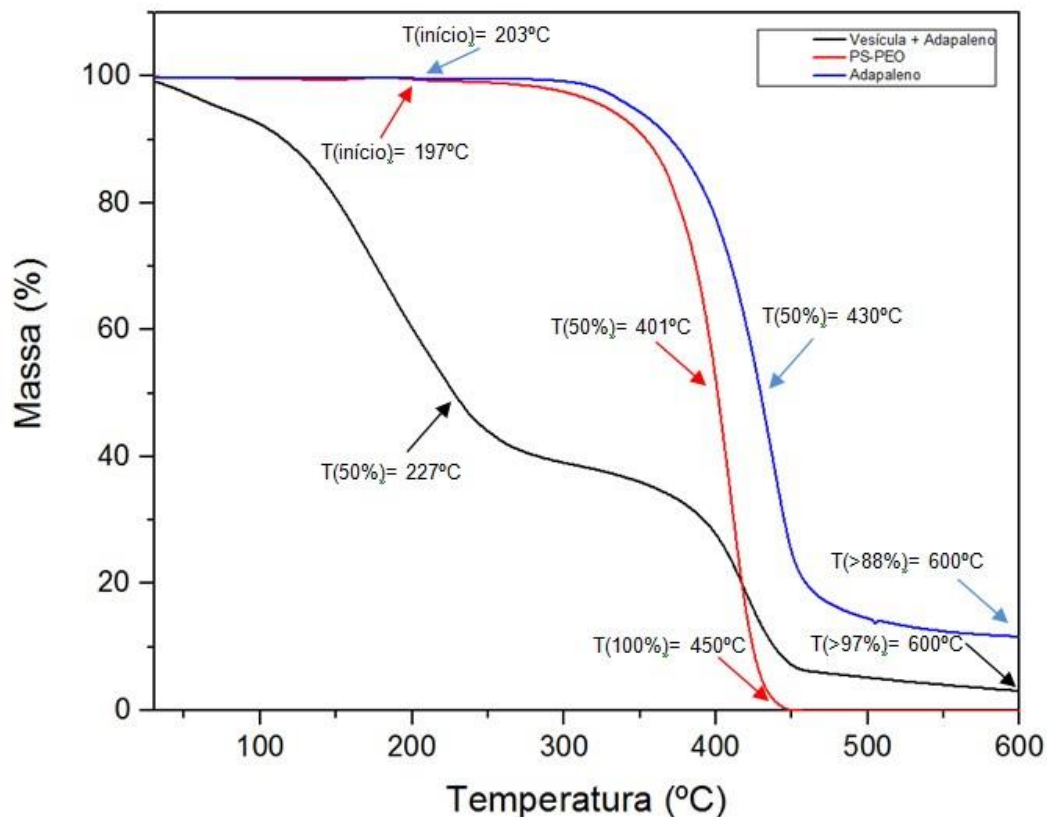
Figura 5.7 - Espectro de FTIR do 1,4-dioxano, formulação contendo vesículas sem adapaleno e formulação contendo vesículas com adapaleno.

Após a realização da rotoevaporação as formulações contendo as VP's vazias e carregadas com o AD foram submetidas à análise por FTIR. É possível notar a semelhança apresentada pelos seus respectivos espectros, onde observa-se a presença de bandas amplas entre os números de onda  $3600\text{-}2900\text{cm}^{-1}$  e  $3700\text{-}2900\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas ao estiramento O-H resultantes de conformações de ligações de hidrogênio fracas e fortes, provenientes da água presente nas dispersões, como também do estiramento C-H proveniente do pico de absorção do bloco PS, comum entre  $3100\text{-}3020\text{cm}^{-1}$ . (ZHANG *et al.*, 2007; LUONG *et al.*, 2011). Ainda, relativo à água presente, é possível observar a banda  $1635\text{cm}^{-1}$  que representa a flexão da água ligada ao hidrogênio (FROST; KLOPROGGE, 2000). Segundo LUONG *et al.*, 2011, o formato e a posição dos espectros dependem do caráter da ligação de hidrogênio presente nas soluções.

A ausência dos picos característicos de éteres relacionados ao estiramento assimétrico da ligação C-O nos espectros das formulações são um indicativo de que houve a evaporação do solvente 1,4-dioxano durante o processo de rotoevaporação. A presença de bandas amplas relacionadas aos estiramentos O-H resultantes das ligações de hidrogênio ocasionadas pela presença da água nestas formulações corroboram com esse indicativo, pois segundo LUONG *et al.*, 2011, estes estiramentos da molécula de água diminuem com o aumento da concentração de 1,4-dioxano, já que as ligações de hidrogênio da água tendem a enfraquecer na presença do solvente.

## 5.5 Termogravimetria (TG)

Na Figura 5.8 são apresentadas as curvas TG do copolímero em bloco PS-PEO, do Adapaleno e das vesículas contendo o AD carregado. Foi observado que, a decomposição do copolímero iniciou-se a uma temperatura aproximada de 198°C, sendo que ao atingir a temperatura de 450°C a perda de massa havia sido completa. CHIEFFI *et al.* 2014 encontrou, para a amostra de PS-PEO, uma perda de massa quase completa (>99%) ao atingir uma temperatura de 458°C, indicando que o tratamento térmico a 600°C promove a remoção completa do composto orgânico.



**Figura 5.8** - Análise da TG do copolímero PS-PEO, do Adapaleno e das Vesículas carregadas com o AD.

Ainda analisando-se a Figura 5.8, é possível observar que a decomposição do adapaleno inicia-se a uma temperatura aproximada de 203°C. Entretanto, não foi possível obter tal informação sobre as vesículas carregadas, já que ao ser preparada para análise a amostra apresentou-se úmida, causando interferência na leitura inicial. WANG *et al.* (2012a) verificaram em seu trabalho, após submeter micropartículas de PS-PEO carregadas com sílica (SiO<sub>2</sub>) à análise termogravimétrica, que ocorreu uma perda de 10,7% em massa até atingir a temperatura de 200°C. Essa perda foi atribuída à liberação de água presente nos compósitos, ocorrendo, a partir desse ponto, a diminuição evidente da massa do copolímero até sua degradação completa, que ocorreu próximo a temperatura de 500°C, restando apenas a sílica como resíduo.

Tanto o fármaco, quanto as vesículas carregadas, não apresentaram a perda completa da massa, indicando que há a presença de resíduos cuja temperatura de degradação total está acima dos 600°C. O tratamento térmico promovido foi capaz de degradar

88,43% da massa total do adapaleno e 97,02% da massa total das vesículas carregadas com o fármaco, o que indica a presença de 11,57% e 2,98% de resíduos, respectivamente. Como o copolímero apresentou degradação total da sua massa e as vesículas são constituídas apenas de PS-PEO e AD, podemos concluir que os resíduos apresentados pela amostra contendo as vesículas carregadas são provenientes do fármaco.

É possível concluir também que os processos utilizados para a produção dos filmes de gelatina e colágeno não são capazes de causar a decomposição das vesículas e do fármaco, já que a temperatura utilizada para realizar a dissolução dos polímeros e a secagem do colágeno encontra-se abaixo da temperatura cuja decomposição se inicia.

## **5.6 Análise da Presença de Cristais de Adapaleno por Microscopia de Luz Polarizada**

A Figura 5.9a e a Figura 5.9b foram obtidas por intermédio da microscopia de luz polarizada com o objetivo de verificar a presença de cristais de AD antes e após a realização da filtração utilizando filtro de acetato de celulose com poros de 4 $\mu$ m de diâmetro. Os resultados mostram que o processo de filtração foi eficiente na retenção dos cristais de AD, que são os resíduos do fármaco não encapsulado.

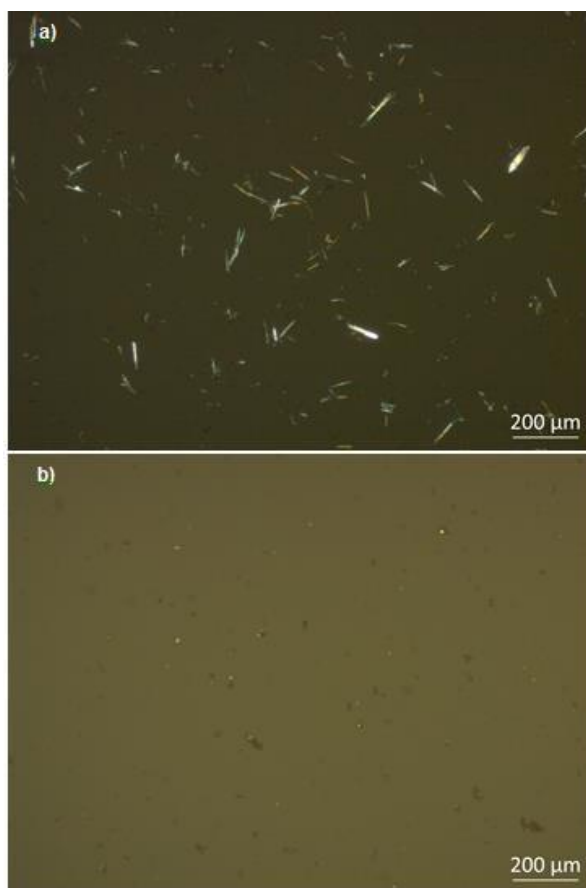


Figura 5.9 - Imagens de microscopia de luz polarizada indicando a presença de cristais de adapaleno na amostra sem filtrar (a) e a ausência dos cristais de adapaleno na amostra após filtrar (b).

## 5.7 pH de Superfície

O valor do pH de superfície dos filmes de gelatina e dos filmes de colágeno foram obtidos através do uso de fitas de pH sobre a superfície umedecida das amostras (Figura 5.10) conforme foi descrito na seção 4.4.7. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3, e mostram que os filmes apresentam um valor de pH levemente ácido, assim como era esperado.

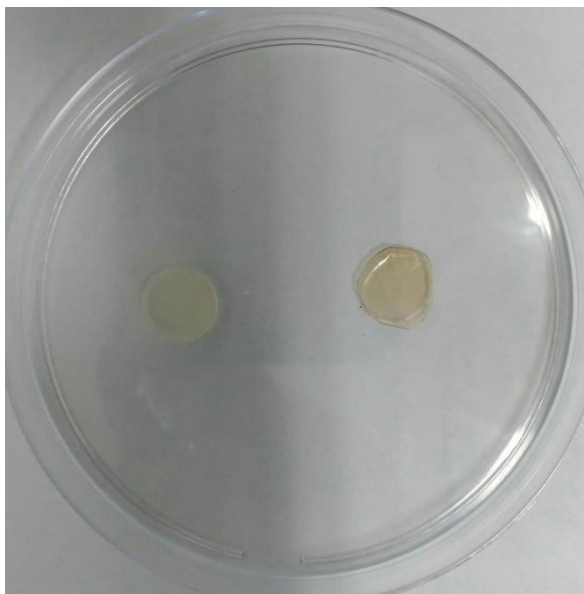


Figura 5.10 - Amostras de 8mm dos filmes de gelatina e colágeno, respectivamente.

**Tabela 5.3** - Valor do pH da superfície dos filmes de colágeno e gelatina.

<b>Amostra</b>	<b>pH</b>
Gelatina com SSD	5,6 ± 0,4
Gelatina com vesícula carregada	5,3 ± 0,4
Gelatina com AD Livre	5,3 ± 0,4
Colágeno com SSD	5,6 ± 0,4
Colágeno com vesícula carregada	5,3 ± 0,4
Colágeno com AD Livre	5,3 ± 0,4

A pele normalmente apresenta um valor de pH levemente ácido, variando de 5,4 a 5,9, enquanto que o pH corporal interno está próximo do neutro (7 a 9). Esse valor de pH levemente ácido proporciona à pele um ambiente que dificulta a entrada de bactérias e subsequente desenvolvimento de infecções. Além disso, o processo de cicatrização de um ferimento envolve componentes biológicos como fibroblastos, neutrófilos e plaquetas, que são influenciados pela alteração do pH. Quando ocorre grande variação do valor de pH a migração de células e a produção de protease pode ser afetada (RIPPKE *et al.*, 2002, 2004; ALI; YOSIPOVITCH, 2013).

Ferimentos ocasionados por queimadura expõem as camadas da pele, sendo essa exposição proporcional ao tamanho e profundidade da lesão. Quando ocorre o extravasamento dos líquidos extracelulares, há um aumento do valor do pH do ferimento, tornando-o ligeiramente mais alcalino, retardando o processo de cura e aumentando a probabilidade de ocorrer infecções. Devido a esses fatores, é importante que os filmes produzidos apresentem um valor de pH semelhante ao da pele, para quando ocorrer sua aplicação em lesões, o mesmo possa realizar a manutenção do pH, mantendo-o com caráter levemente ácido (SHARPE *et al.*, 2013; MILNE; CONNOLLY, 2014).

## 5.8 Ensaio de Liberação

### 5.8.1 Avaliação da Solubilidade dos Fármacos no Meio de Dissolução

A manutenção da condição *sink* é um requisito crucial para estudos de liberação *in vitro* de fármacos no campo farmacêutico (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2012). Na condição *sink*, a concentração do fármaco no meio de dissolução não pode exceder 10 a 33% da solubilidade do fármaco nestes fluidos (ROSSI *et al.*, 2007). Visando manter essa condição foi avaliada a solubilidade do AD e da SSD no meio de liberação utilizado (Tabela 5.4 e Tabela 5.5).

**Tabela 5.4** - Solubilidade do AD no meio de dissolução.

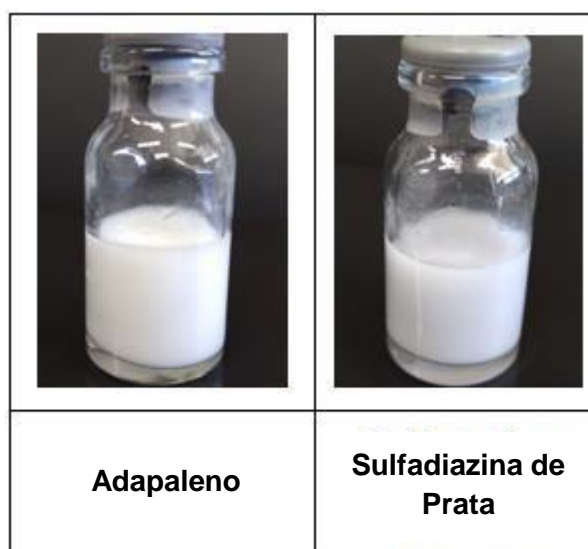
<b>Adapaleno</b>		
Amostra	Absorbância	Concentração (µg/mL)
AD1	1,410	19,46
AD2	1,516	20,92
AD3	1,457	20,11
Média	1,461 ± 0,037	20,16 ± 0,504



**Tabela 5.5** - Solubilidade do AD no meio de dissolução.

<b>Sulfadiazina de Prata</b>		
Amostra	Absorbância	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
SSD1	11,893	293,37
SSD2	11,859	292,53
SSD3	11,845	292,18
Média	$11,867 \pm 0,018$	$292,693 \pm 0,451$

Considerando-se os valores obtidos, e observando-se a presença de AD e SSD insolúvel na suspensão do estudo de liberação, conforme mostra a Figura 5.11, é possível concluir que a solubilidade máxima ocorre a uma concentração de  $20,16 \pm 0,504 \mu\text{g/mL}$  e  $292,693 \pm 0,451 \mu\text{g/mL}$  para o Adapaleno e a Sulfadiazina de Prata, respectivamente.

**Figura 5.11** - Suspensão de AD e SSD após 24 horas de agitação e aquecimento a 37°C.

### 5.8.2 Determinação do Adapaleno no Estudo de Liberação

Para a determinação quantitativa do AD nos estudos de liberação foram construídas 3 curvas analíticas. Para obtenção dos pontos da curva foram realizadas diluições em solução tampão PBS:Etanol acrescido de Tween 60 a partir da solução estoque,

conforme foi detalhado na seção 4.5, obtendo-se uma faixa de trabalho de 0,4 a 20,0µg/mL.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 0,081 e 0,271µg/mL, respectivamente, indicando que o método desenvolvido é suficientemente sensível para a quantificação do AD.

A análise estatística das 3 curvas obtidas mostrou que a inclinação e o intercepto das três não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ), podendo ser obtida uma curva única. Adicionalmente, as curvas obtidas atenderam as premissas básicas para adequação do modelo de regressão linear: a inclinação das retas foi significativamente diferente de zero ( $p < 0,0001$ ), sendo observada normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0,10$ ) e homocedasticidade nos dados brutos e nos resíduos (teste de Bartlett,  $p > 0,05$ ), bem como ausência de correlação dos erros ( $p > 0,05$ ). Assim, a curva obtida a partir das 3 curvas iniciais, representada na Figura 5.12, apresentou coeficiente de determinação adequado ( $r^2 = 0,9998$ ), indicando uma forte relação linear positiva entre as concentrações de AD em solução e a absorbância medida no equipamento, estando de acordo com o exigido pela RE 899 (ANVISA, 2003). Desta forma, o método analítico mostrou boa linearidade dentro da faixa de trabalho proposta. A equação da reta obtida da análise de regressão linear foi:  $y = 0,07215 x + 0,006175$ .

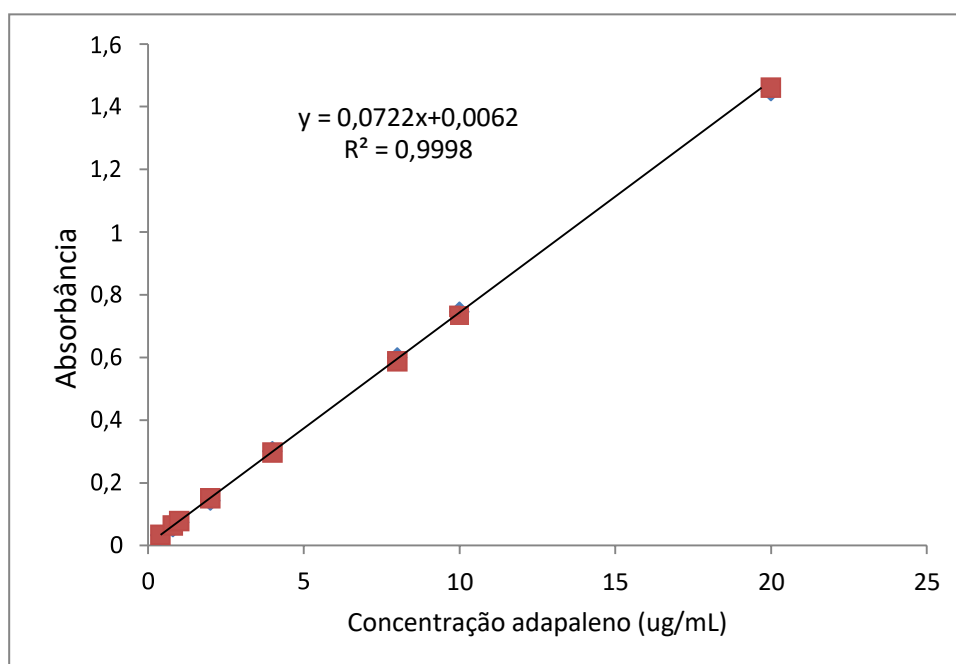


Figura 5.12 - Curva analítica para o Adapaleno em Solução PBS:Etanol + T60 realizado em UV-Vis.

### 5.8.3 Determinação da Sulfadiazina de Prata no Estudo de Liberação

Para a determinação quantitativa da SSD nos estudos de liberação foram construídas 3 curvas analíticas, usando-se como solução estoque uma solução de SSD em ácido clorídrico na concentração de 500µg/mL. Para construção dos pontos da curva foram realizadas diluições em solução tampão PBS:Etanol acrescido de Tween 60 a partir da solução padrão, conforme foi detalhado na seção 4.5, obtendo-se uma faixa de concentração de 6,5 a 200,0µg/mL.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 1,10 e 3,66µg/mL, respectivamente, indicando que o método desenvolvido é suficientemente sensível para a quantificação do SSD.

As três curvas obtidas foram avaliadas quanto às premissas para adequação do modelo de regressão linear, sendo que: os dados amostrais apresentaram distribuição normal; os resíduos apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0,10$ ) e homocedasticidade (teste de Bartlett); a regressão linear foi significativa, sendo o valor de p obtido menor que o nível de significância de 0,05, indicando ausência de desvio da linearidade. Também foi verificada a aleatoriedade significativa dos erros ( $p > 0,05$ ), indicando que não há correlação entre os resíduos.

Após a avaliação das premissas obrigatórias e, a partir de um modelo de regressão linear significativo, observou-se que tanto os valores de inclinação quanto de intercepto para as três retas não foram estatisticamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ), sendo possível concluir que as retas são equivalentes. Assim, pôde-se obter um valor comum de inclinação e de intercepto entre as três retas, formando uma única equação da reta:  $y = 0,0405x + 0,0117$ , mostrada na Figura 5.13. O coeficiente de determinação obtido também foi adequado ( $r^2 = 0,09998$ ) indicando uma forte relação linear positiva entre as concentrações de SSD em solução e a absorvância medida no equipamento, estando de acordo com o exigido pela RE 899 (ANVISA, 2003).

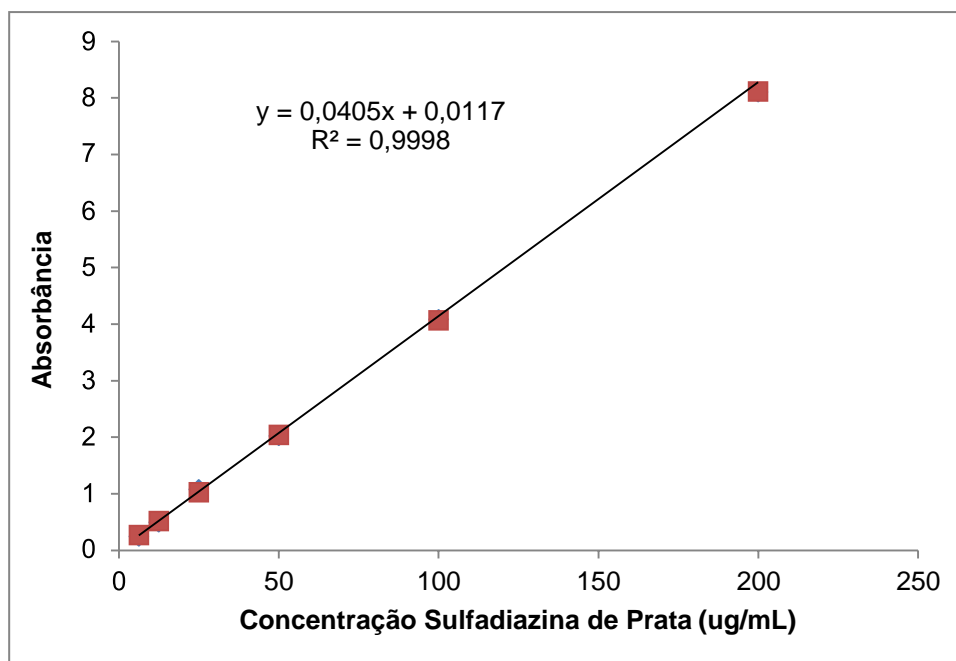


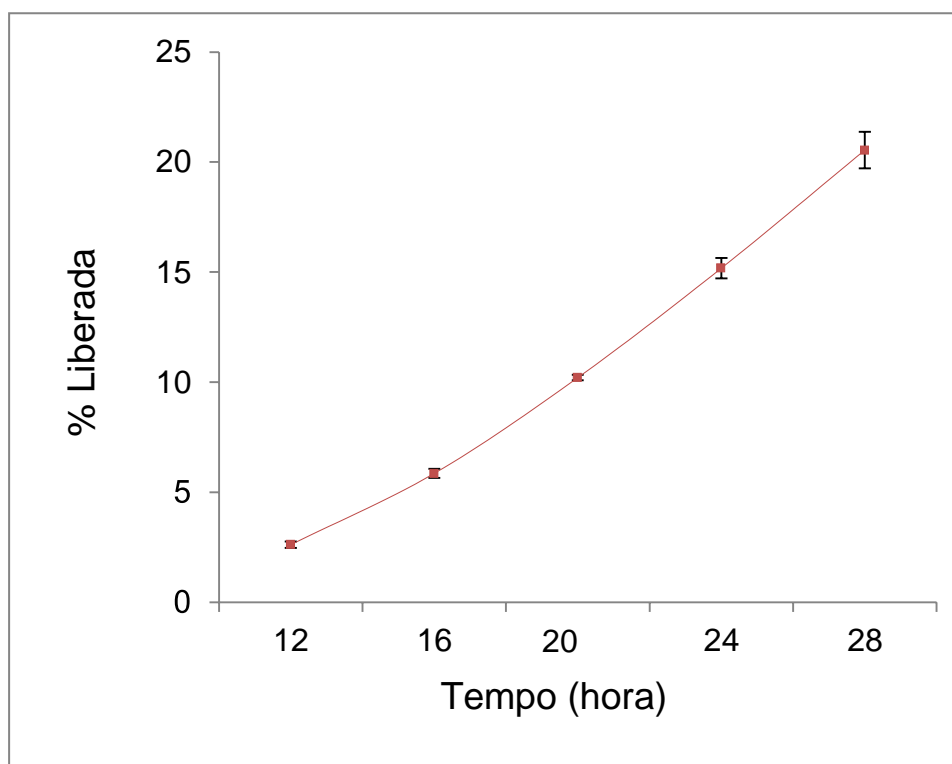
Figura 5.13 - Curva analítica para a Sulfadiazina de Prata em Solução PBS:Etanol + T60 realizado em UV-Vis.

#### 5.8.4 Estudo de Liberação do Adapaleno a partir das Vesículas Poliméricas

O estudo do perfil de liberação do AD a partir das vesículas poliméricas foi conduzido em solução tampão PBS:Etanol na proporção 70:30 acrescida de 2% de Tween 60. As amostras coletadas (n= 3) foram lidas em espectrofotômetro na região do UV e quantificadas com base nas curvas de calibração obtidas. Os resultados obtidos estão apresentados Tabela 5.6 e na Figura 5.14. É importante ressaltar que a maior taxa de liberação obtida (0,93µg/mL no tempo 28 horas, amostra 2), corresponde a 4,61% da solubilidade obtida para o AD (20,16µg/mL) nas condições do estudo, mostrando que a condição *sink* foi respeitada.

**Tabela 5.6** – Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo.

Tempo (horas)	Concentração por Tempo	Concentração Acumulada	%liberada
12	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02	2,62 ± 0,14
16	0,52 ± 0,03	0,94 ± 0,03	5,85 ± 0,20
20	0,70 ± 0,05	1,65 ± 0,02	10,21 ± 0,12
24	0,80 ± 0,06	2,45 ± 0,08	15,18 ± 0,47
28	0,86 ± 0,06	3,32 ± 0,13	20,54 ± 0,83



**Figura 5.14** - Perfil de liberação de AD pelas VP's.

O início da coleta da amostra a partir das 12 horas no estudo de liberação *in vitro* do AD a partir das vesículas foi estabelecido com base em outros ensaios realizados anteriormente, onde a liberação foi testada durante um período de 24 horas. Nesses estudos, as alíquotas foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 8 e 24 horas, porém somente foi possível quantificar o AD no tempo 24 horas, assim como observado por PORTO (2011). Assim, o conjunto dos dados mostra que não foi observado nenhum

*burst release*, mas sim uma liberação gradual e constante do fármaco. A liberação prolongada de fármaco e ausência de *burst release* são fundamentais para o desenvolvimento de formulações de liberação controlada.

Para entender melhor o mecanismo de liberação do AD a partir das vesículas poliméricas, a partir dos pontos obtidos foram realizados cálculos de cinética liberação utilizando diferentes modelos cinéticos – ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, Hixson-Crowell conforme descrito na seção 4.6.

Os gráficos das regressões lineares obtidas para cada um dos modelos estudados estão ilustrados nas seguintes figuras: Figura 5.15, Figura 5.16, Figura 5.17 e Figura 5.18.

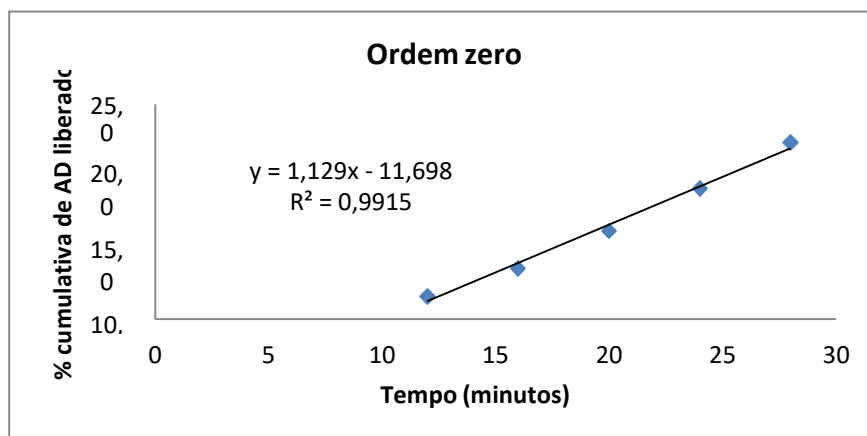


Figura 5.15 - Representação gráfica do modelo cinético de Ordem Zero.

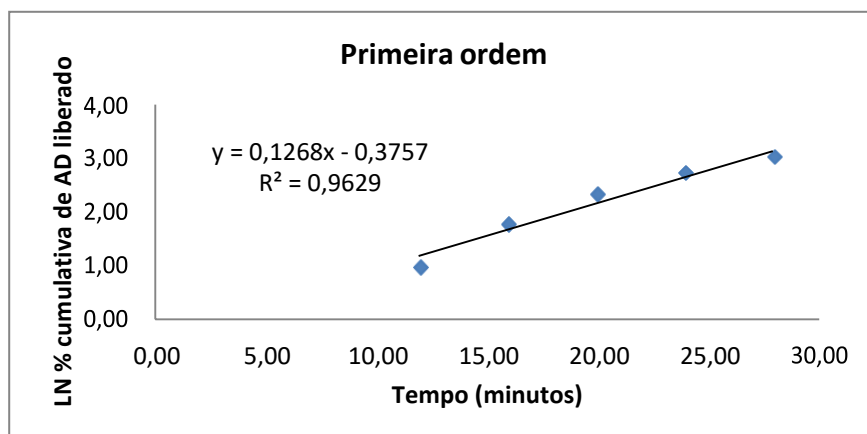
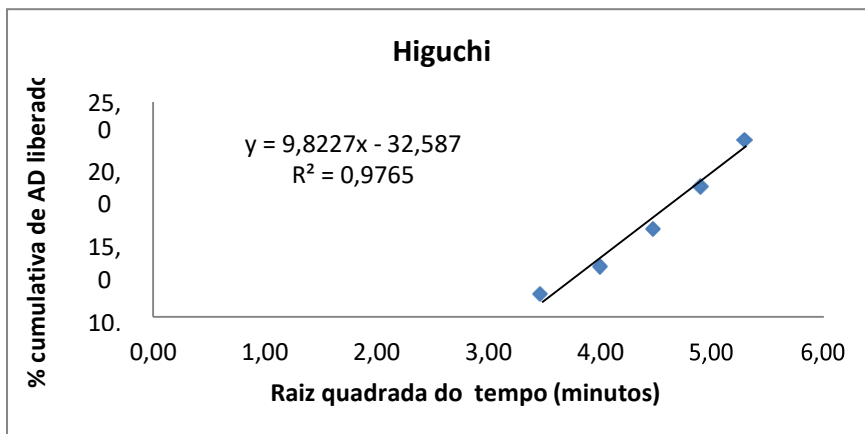
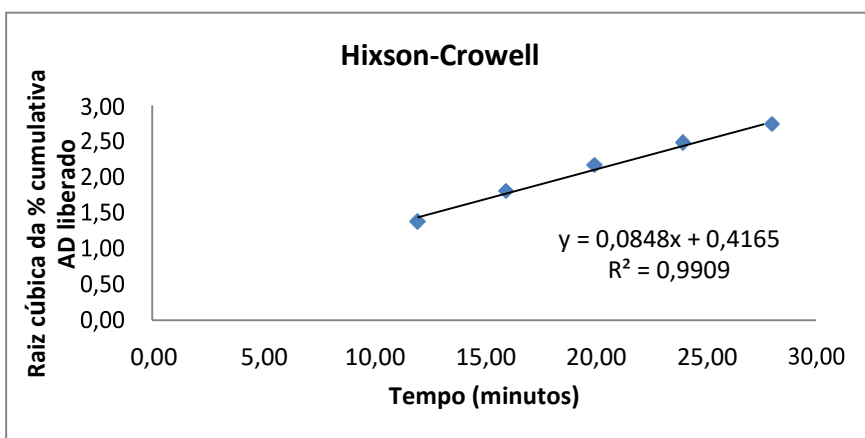


Figura 5.16 - Representação gráfica do modelo cinético de Primeira Ordem.



**Figura 5.17** - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi.



**Figura 5.18** - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell.

Como pode ser observado nas Figuras 5.15 a 5.18, o maior coeficiente de determinação foi obtido para o modelo de ordem zero ( $R^2 = 0,9915$ ). Este modelo baseia-se na liberação lenta do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não desagregam, liberando o fármaco lentamente. As formas farmacêuticas que seguem esse perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, sendo o mecanismo de liberação ideal para a obtenção de uma ação farmacológica prolongada (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; DASH *et al.*, 2010).

A fim de se avaliar mais detalhadamente o mecanismo de liberação do fármaco, a cinética de liberação também foi avaliada pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, Figura 5.19. Como pode ser observado, o modelo apresentou-se adequado ( $R^2 = 0,9952$ ) e o valor de "n" obtido foi de 2,4, cujo mecanismo de liberação corresponde ao transporte

super caso-II e exibiu uma cinética próxima da ordem zero. Perfis semelhantes também foram observados por ZÓTTOWSKA *et al.*, 2017 e SONAWANE *et al.*, 2016 ao avaliarem a liberação de fármacos a partir de carreadores poliméricos biodegradáveis. O conjunto desses dados fornecem indícios de que a desestruturação das vesículas poliméricas acontece muito lentamente, liberando o fármaco de maneira contínua ao longo do tempo (Tabela 5.6).

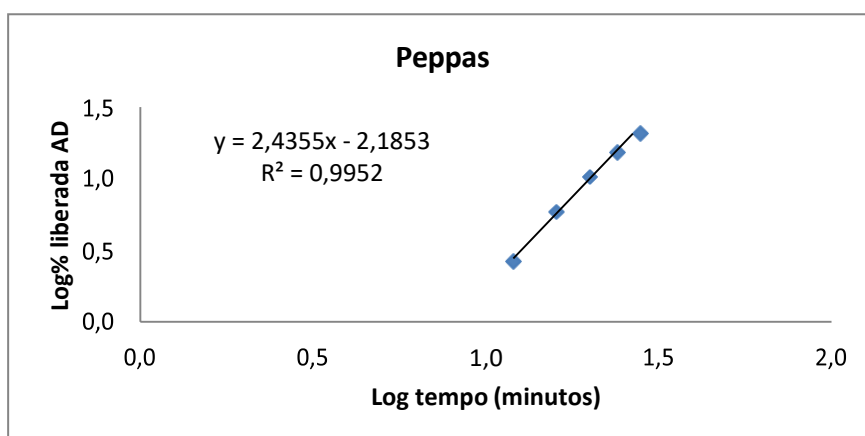


Figura 5.19 - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeier-Peppas.

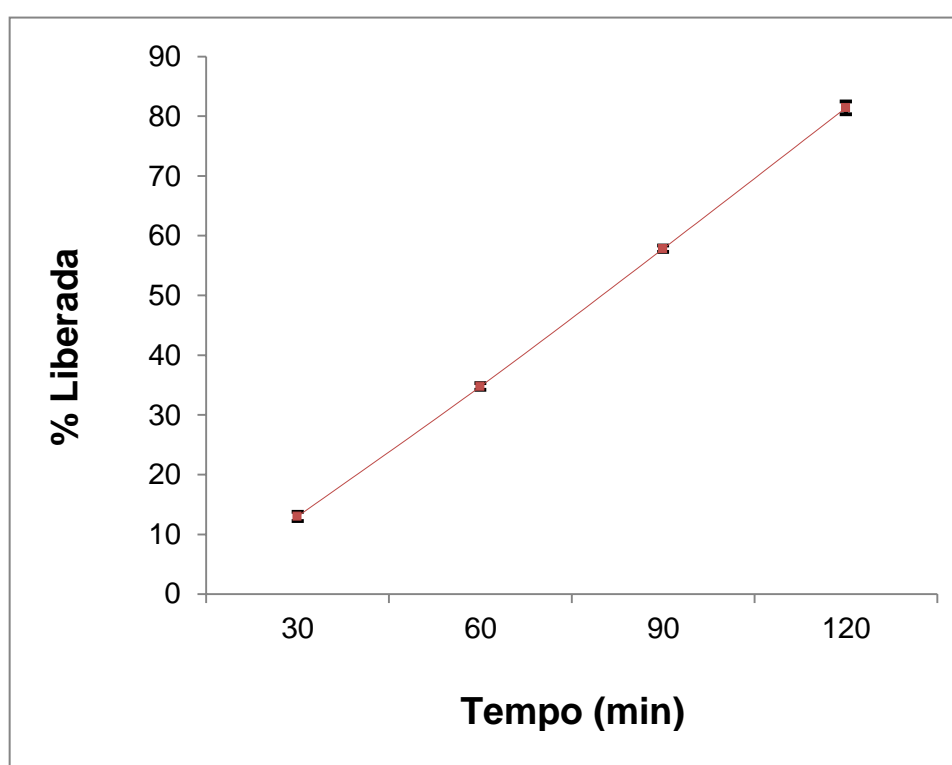
### 5.8.5 Estudo de Liberação do Adapaleno pelos Filmes de Gelatina e Colágeno

Estudos de liberação do AD a partir dos filmes de gelatina e colágeno também foram conduzidos. Através do valor da concentração acumulada foi possível determinar também a taxa liberada (%). A Tabela 5.7 exibe os valores da concentração de AD acumulada e da taxa de AD liberada em função do tempo pelos filmes de gelatina, sendo que a partir desses valores foi possível obter perfis de liberação do fármaco (Figura 5.20). Já a Tabela 5.8 exibe os valores da concentração de AD acumulada e da taxa de AD liberada em função do tempo, pelos filmes de colágeno, sendo também possível obter os perfis de liberação do AD a partir desses valores (Figura 5.21). Também nestes estudos a condição *sink* foi mantida, visto que as maiores taxas de liberação obtidas, respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno, foram: 3,56 $\mu$ g/mL (tempo 120 minutos, curva 3) e 3,71 $\mu$ g/mL (tempo 150 minutos, curva 2), correspondendo a 17,7% e 18,40% da solubilidade obtida para o AD (20,16 $\mu$ g/mL) nas condições do estudo.



**Tabela 5.7** – Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de gelatina.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Concentração por Tempo</b>	<b>Concentração Acumulada</b>	<b>%liberada</b>
30	1,91 ± 0,11	1,91 ± 0,11	13,02 ± 0,76
60	3,20 ± 0,10	5,11 ± 0,08	34,76 ± 0,54
90	3,39 ± 0,09	8,50 ± 0,08	57,82 ± 0,53
120	3,47 ± 0,09	11,97 ± 0,16	81,41 ± 1,09



**Figura 5.20** - Perfil de liberação de AD pelos filmes de gelatina.

**Tabela 5.8** – Valores médios de concentração de AD, por tempo e acumulada, e taxa de AD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de colágeno.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Concentração por Tempo</b>	<b>Concentração Acumulada</b>	<b>%liberada</b>
30	1,97 ± 0,08	1,97 ± 0,08	11,51 ± 0,44
60	3,05 ± 0,12	5,02 ± 0,20	29,37 ± 1,14
90	3,31 ± 0,04	8,33 ± 0,22	48,74 ± 1,28
120	3,60 ± 0,04	11,93 ± 0,26	69,77 ± 1,52
150	3,67 ± 0,05	15,60 ± 0,31	91,23 ± 1,80

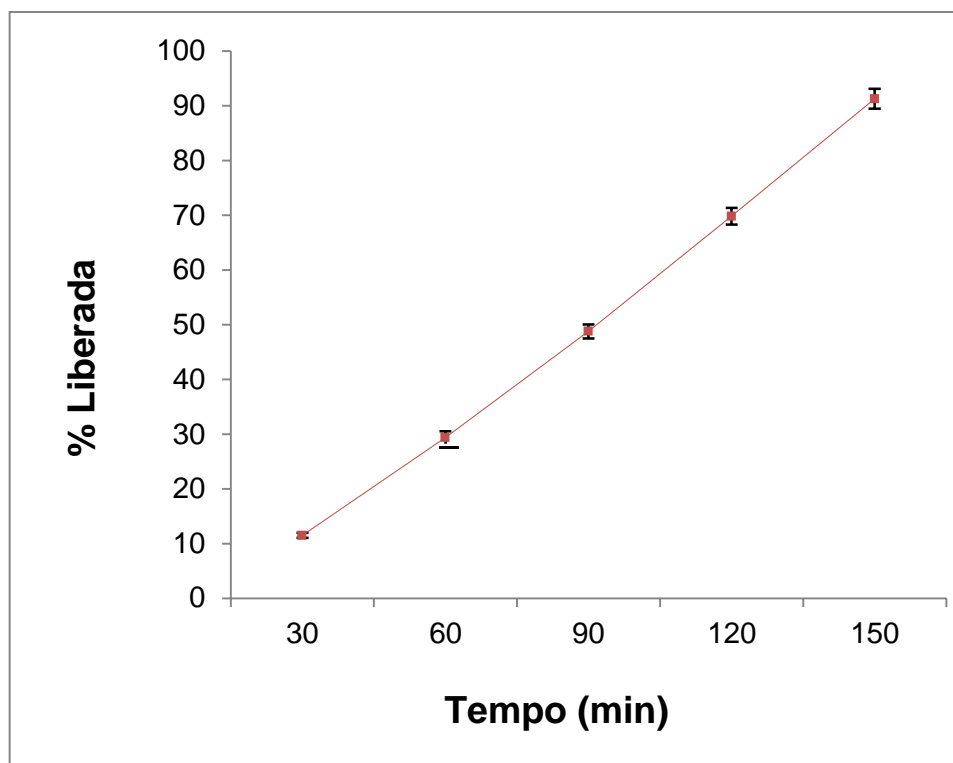


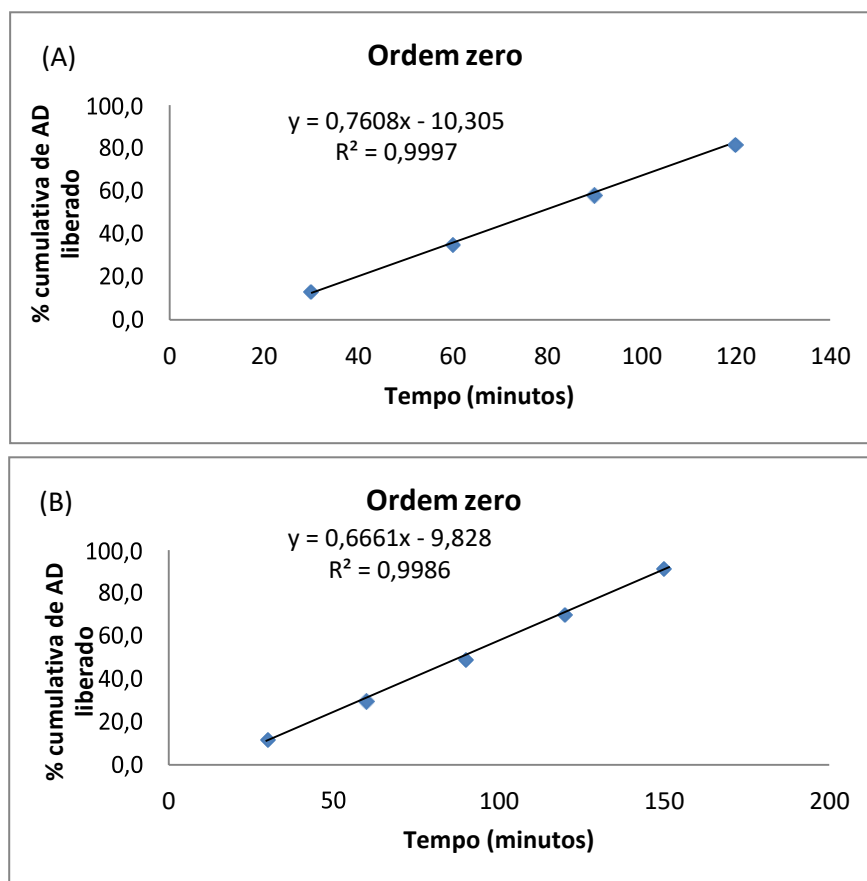
Figura 5.21 - Perfil de liberação de AD pelos filmes de colágeno.

Todas as amostras apresentaram liberação do AD nos primeiros 30 minutos de inserção no meio, o que pode ser explicado pela alta solubilidade da matriz de gelatina e de colágeno na solução tampão, que permitiu a liberação do analito. Após o período de 120 e 150 minutos os filmes de gelatina e colágeno apresentaram, respectivamente, degradação completa, impossibilitando a realização do ensaio por um período maior de tempo.

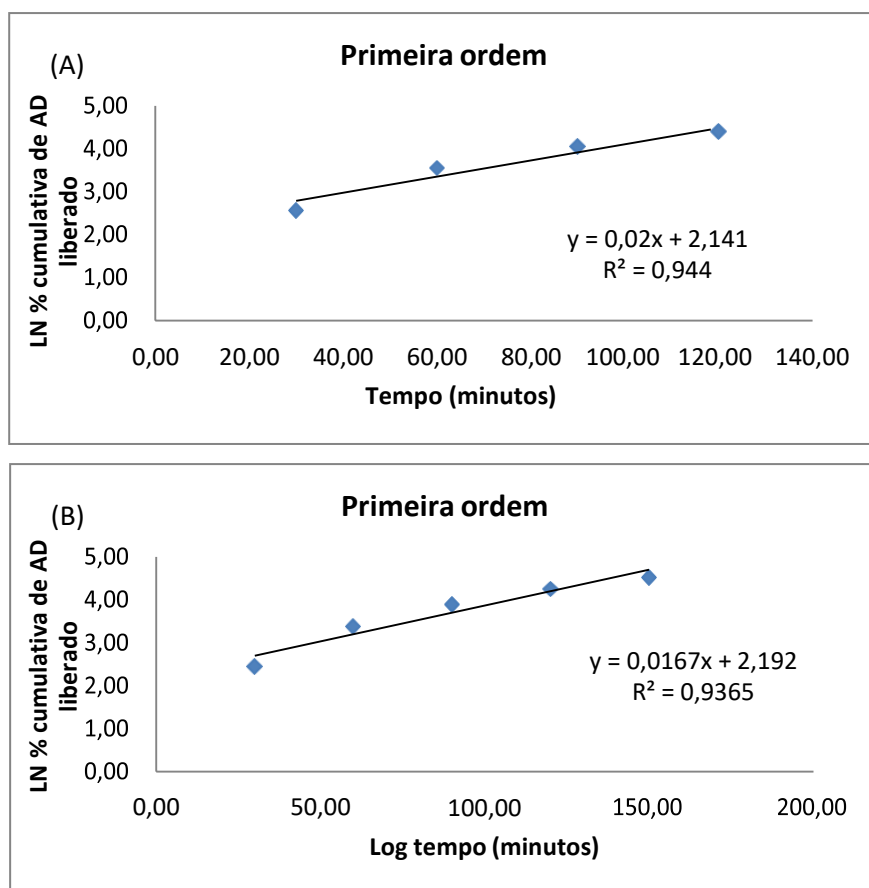
Para entender melhor o mecanismo de liberação do AD a partir dos filmes de colágeno e gelatina, foram realizados cálculos de cinética de liberação a partir de diferentes modelos cinéticos – ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, Hixson-Crowell conforme descrito na seção 4.6.

Como pode ser observado, novamente, o maior coeficiente de determinação foi obtido para o modelo de ordem zero: 0,9997 e 0,9986, respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno. Ao avaliarmos as tabelas com os dados de liberação (Tabela 5.7 e Tabela 5.8) é possível entender a adequação da cinética de liberação encontrada ao modelo de ordem zero. Embora a liberação do AD seja mais pronunciada a partir do

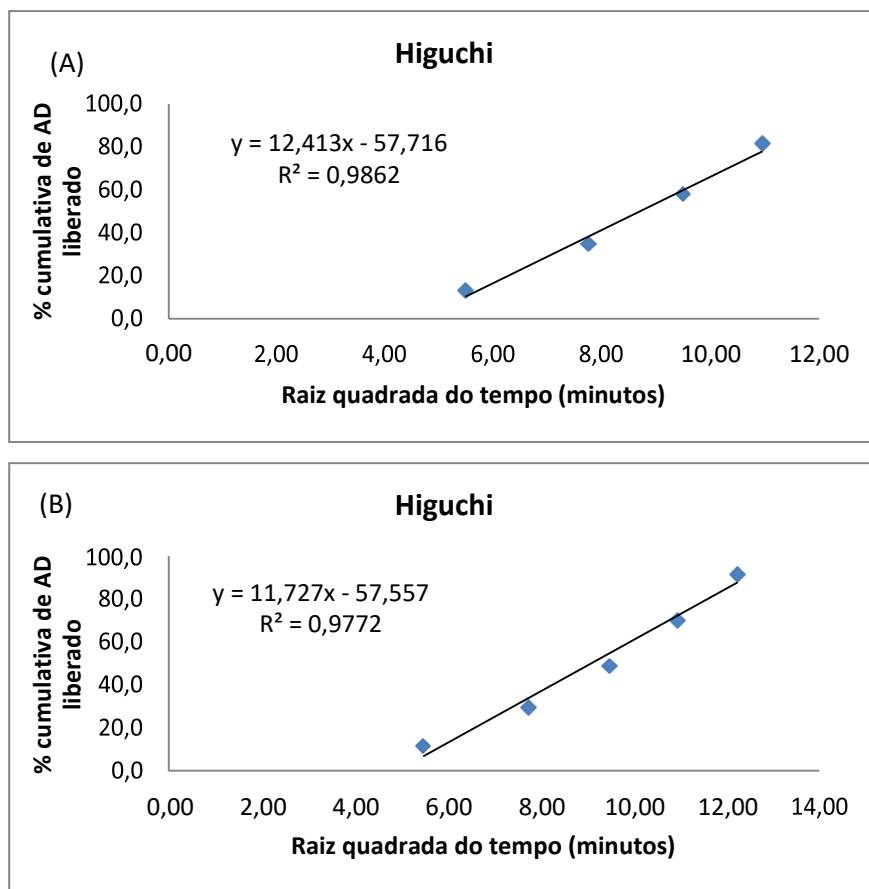
filme do que a partir das vesículas, há uma liberação constante do fármaco por unidade de tempo. Este perfil de liberação tão controlado, apesar do fármaco se encontrar inserido em um filme hidrofílico, que intumescce e se desestrutura ao longo do tempo, pode ser explicada pela baixa solubilidade do AD em meio aquoso, fazendo com que sua dissolução ao longo dos filmes seja lenta e gradual. No entanto, quando comparamos os valores de AD liberados a partir dos filmes de gelatina (11,97µg/mL em 120 minutos) e de colágeno (15,60µg/mL em 150 minutos) com os valores de AD liberado a partir das vesículas poliméricas (3,32µg/mL em 28 horas) é possível entender a contribuição da desestruturação maior dos polímeros do filme em relação aos polímeros das vesículas.



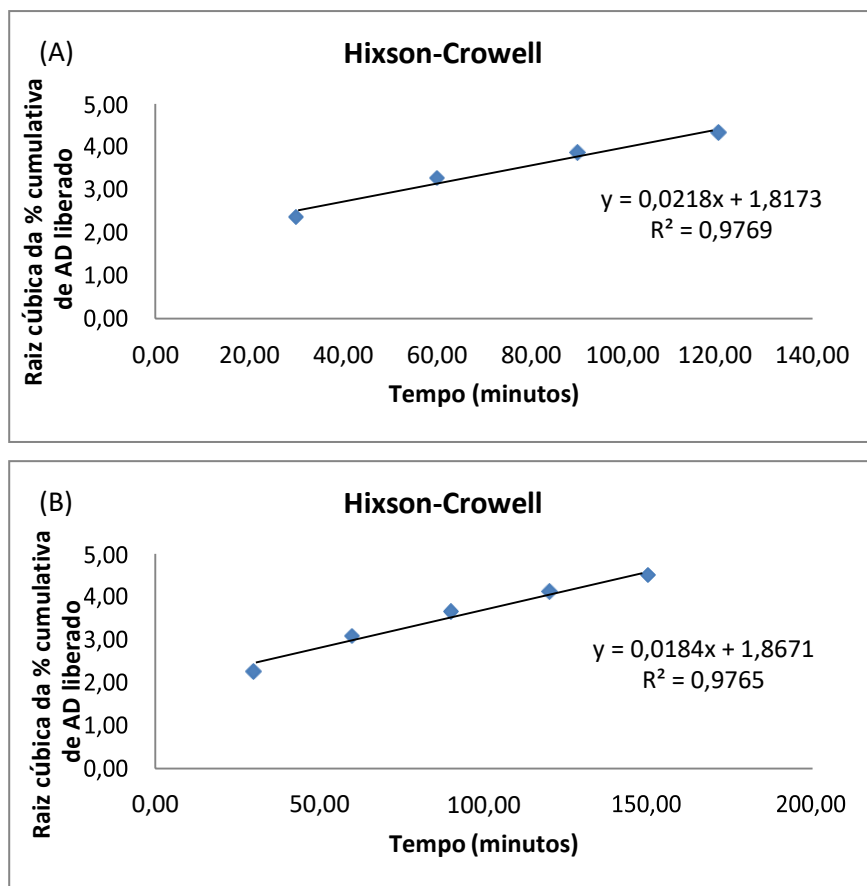
**Figura 5.22-** Representação gráfica do modelo cinético de ordem zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.



**Figura 5.23** - Representação gráfica do modelo cinético de primeira ordem. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

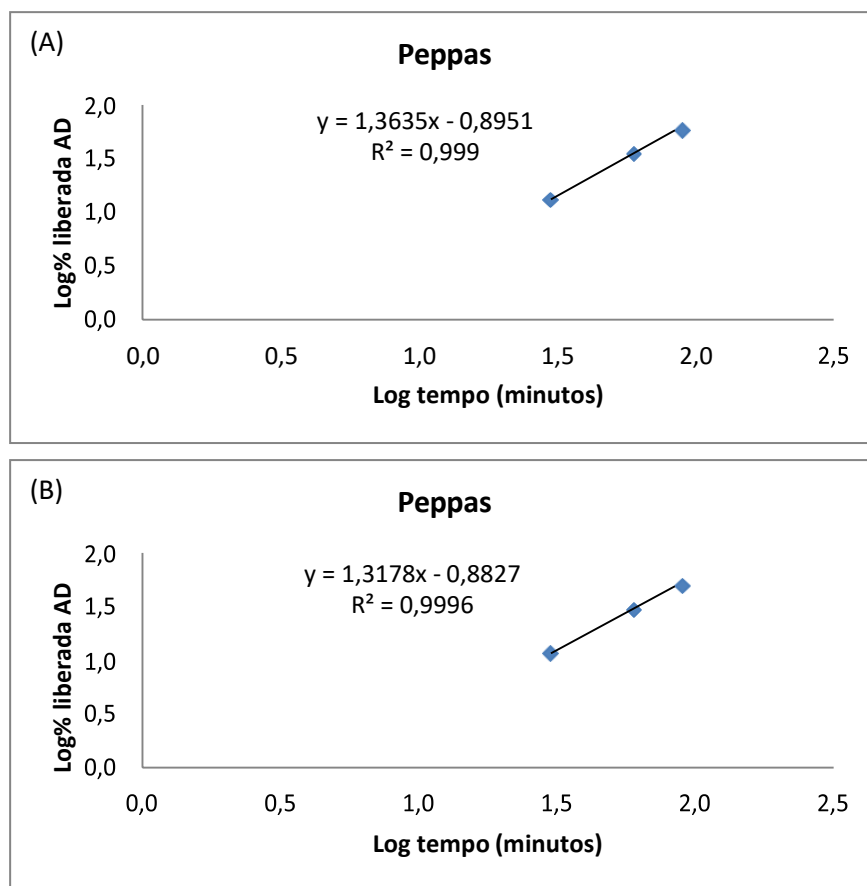


**Figura 5.24** - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.



**Figura 5.25** - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

A fim de avaliar mais detalhadamente o mecanismo de liberação do fármaco, a cinética de liberação também foi avaliada pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (Figura 5.26). Como pode ser observado, o modelo apresentou-se adequado ( $R^2 = 0,999$  e  $0,9996$ , respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno) e o valor de  $n$  obtido foi de  $1,36$  e  $1,32$ , cujo mecanismo de liberação corresponde ao transporte super caso-II e exibiu uma cinética próxima da ordem zero. No mecanismo de transporte super caso-II é esperada a desestruturação da matriz polimérica, o que se observa nos filmes desenvolvidos, porém uma liberação contínua por unidade de tempo também é observada (Tabela 5.7 e Tabela 5.8), o que justifica a adequação das curvas de liberação aos modelos cinéticos encontrados.



**Figura 5.26** - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

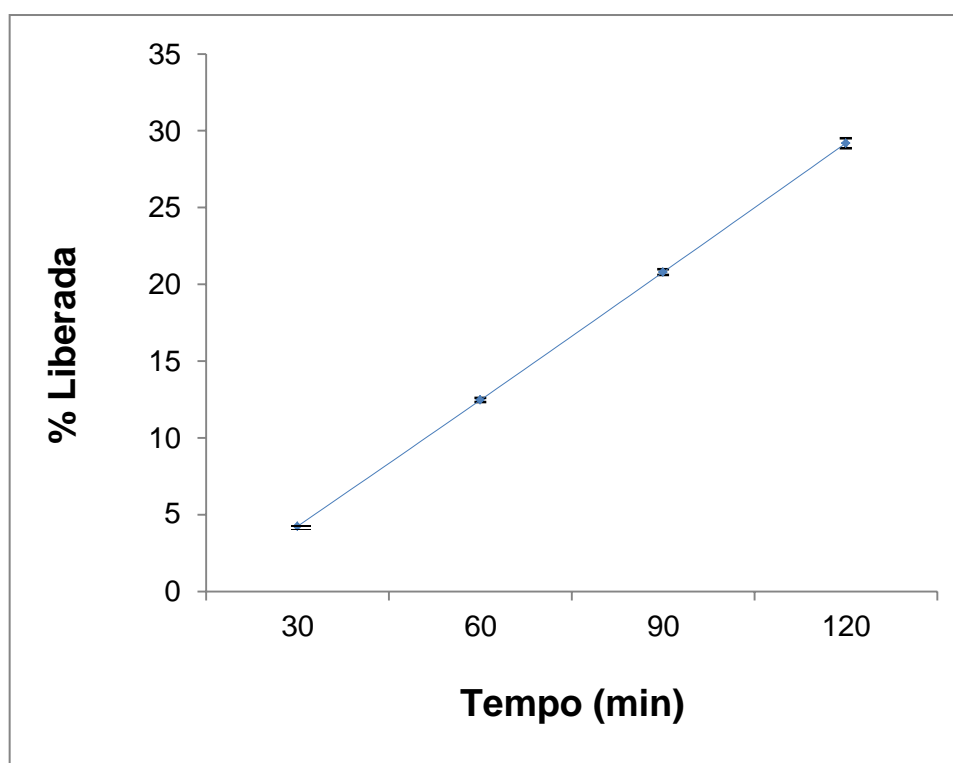
### 5.8.6 Estudo de Liberação da Sulfadiazina de Prata pelos Filmes de Gelatina e Colágeno

Estudos de liberação da SSD a partir de filmes de colágeno e de gelatina também foram conduzidos. Assim, como nos demais estudos de liberação, o meio utilizado para a liberação do fármaco foi uma solução composta por tampão PBS:Etanol na proporção 70:30 acrescida de 2% de Tween 60. A Tabela 5.9 apresenta os valores da concentração de SSD acumulada e da taxa de SSD liberada em função do tempo, pelos filmes de gelatina, sendo que a partir desses valores foi possível se obter perfis de liberação do fármaco (Figura 5.27). Já a Tabela 5.10 exibe os valores da concentração de SSD acumulada e da taxa de SSD liberada em função do tempo, pelos filmes de colágeno, sendo também possível se obter os perfis de liberação do SSD a partir desses valores (Figura 5.28). Também para a SSD, a condição *sink* foi mantida nos estudos

de liberação, visto que as maiores taxas de liberação obtidas, respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno, foram: 62,08 $\mu$ g/mL (tempo 120 minutos, curva 3) e 65,77 $\mu$ g/mL (tempo 150 minutos, curva 3), correspondendo a 21,2% e 22,5% da solubilidade obtida para a SSD (292,69 $\mu$ g/mL) nas condições do estudo.

**Tabela 5.9** – Valores médio de concentração de SSD, por tempo e acumulada, e taxa de SSD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de gelatina.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Concentração por Tempo</b>	<b>Concentração Acumulada</b>	<b>%liberada</b>
30	31,00 $\pm$ 1,35	31,00 $\pm$ 1,35	4,25 $\pm$ 0,19
60	59,90 $\pm$ 0,89	90,90 $\pm$ 0,98	12,47 $\pm$ 0,14
90	60,69 $\pm$ 1,15	151,59 $\pm$ 1,35	20,79 $\pm$ 0,19
120	61,20 $\pm$ 1,30	212,79 $\pm$ 2,32	29,19 $\pm$ 0,32

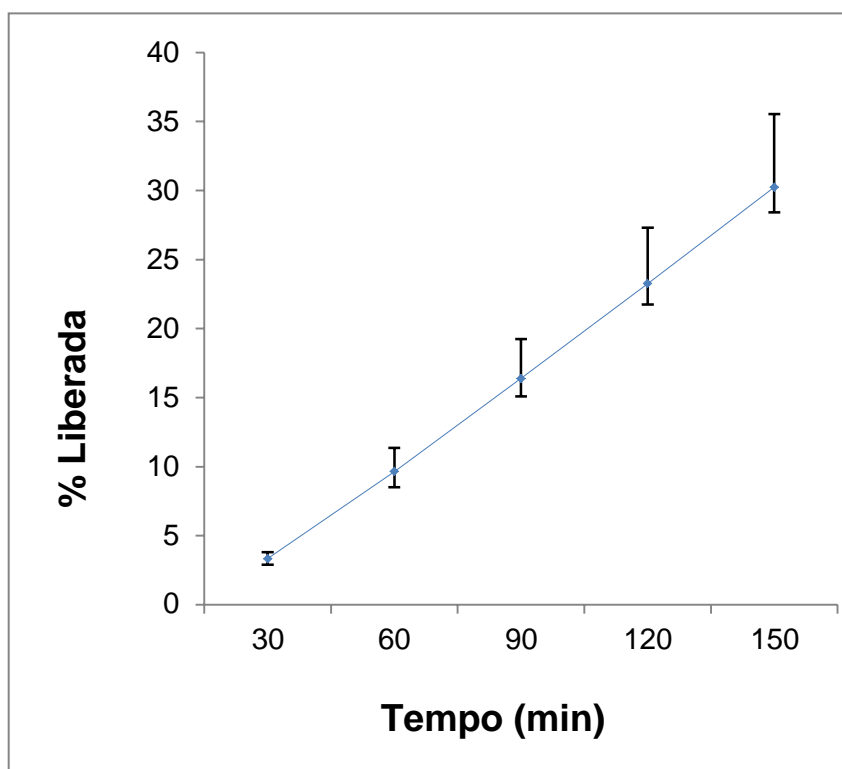


**Figura 5.27** - Perfil de liberação de SSD pelos filmes de gelatina.



**Tabela 5.10** – Valores médios de concentração de SSD, por tempo e acumulada, e taxa de SSD liberada (%) em função do tempo, pelos filmes de colágeno.

Tempo (minutos)	Concentração por Tempo	Concentração Acumulada	%liberada
30	26,91 ± 3,89	26,92 ± 3,89	3,33 ± 0,48
60	51,08 ± 9,92	77,99 ± 13,79	9,65 ± 1,71
90	54,39 ± 9,52	132,38 ± 23,09	16,38 ± 2,86
120	55,58 ± 9,80	187,96 ± 32,78	23,26 ± 4,06
150	56,40 ± 10,03	244,36 ± 42,74	30,24 ± 5,29

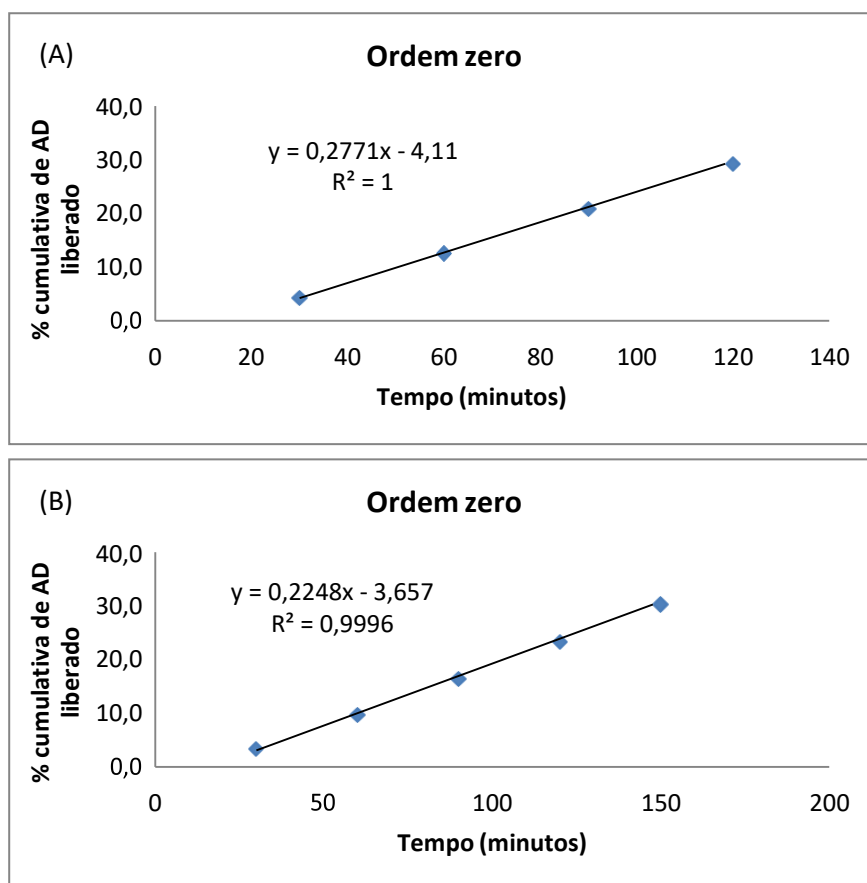


**Figura 5.28** - Perfil de liberação de SSD pelos filmes de colágeno.

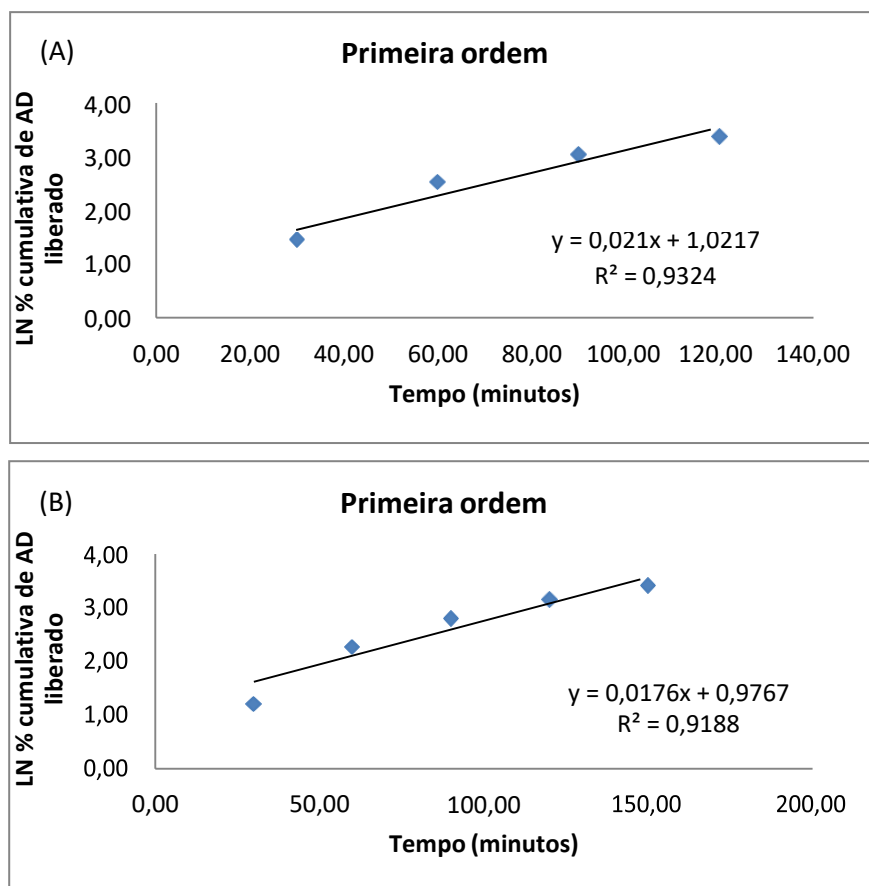
Assim como foi observado para os filmes contendo AD, todas as amostras apresentaram liberação da SSD nos primeiros 30 minutos de inserção no meio, o que pode ser explicado pela alta solubilidade da matriz de gelatina e de colágeno na solução tampão, que permitiu a liberação do analito. Após o período de 120 e 150 minutos, os filmes de gelatina e colágeno apresentaram, respectivamente, degradação completa, impossibilitando a realização do ensaio por um período maior de tempo.

Para entender melhor o mecanismo de liberação da SSD a partir dos filmes de colágeno e gelatina também foram realizados cálculos de cinética liberação a partir de diferentes modelos cinéticos – ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, conforme descrito na seção 4.6.12.

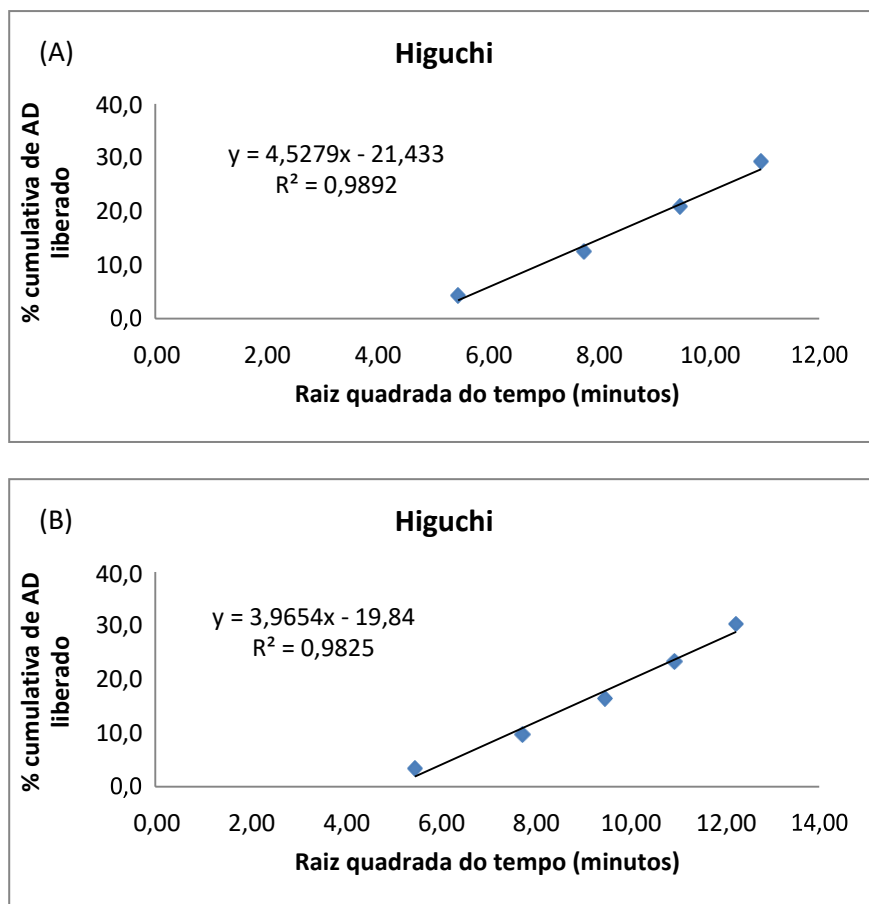
Os gráficos das regressões lineares obtidas para cada um dos modelos estudados estão ilustrados nas Figura 5.29, Figura 5.30, Figura 5.31 e Figura 5.32. Mais uma vez, o maior coeficiente de determinação foi obtido para o modelo de ordem zero: 1,0 e 0,9996, respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno. Novamente, a liberação contínua por unidade de tempo, esperada em um modelo de cinética de liberação de ordem zero, pode ser comprovada ao avaliarmos a liberação da SSD por unidade de tempo, apresentada nas Tabela 5.9 e Tabela 5.10.



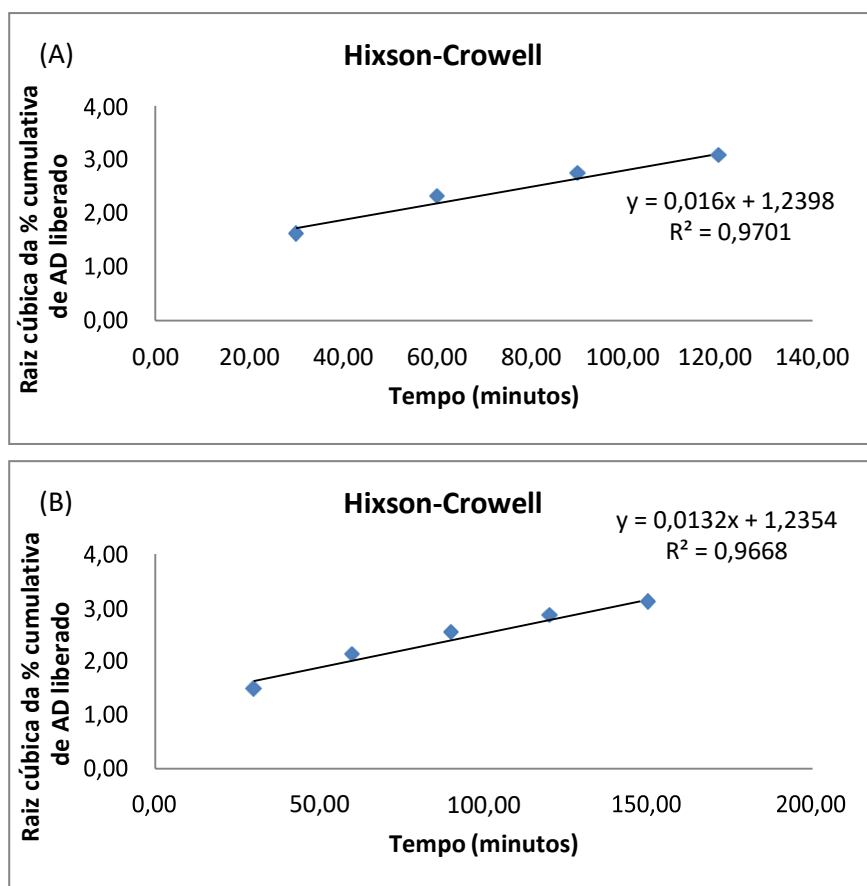
**Figura 5.29** - Representação gráfica do modelo cinético de ordem zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.



**Figura 5.30-** Representação gráfica do modelo cinético de primeira zero. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

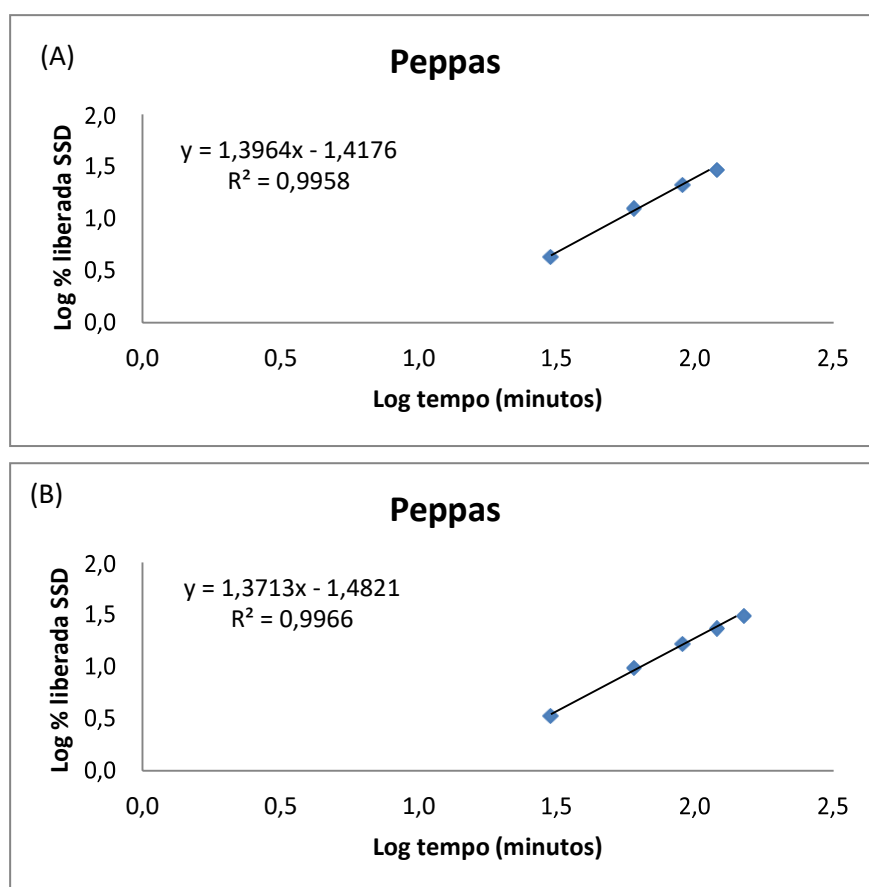


**Figura 5.31** - Representação gráfica do modelo cinético de Higuchi. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.



**Figura 5.32** - Representação gráfica do modelo cinético de Hixson-Crowell. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

Também para estes estudos de liberação, a cinética de liberação foi avaliada pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (Figura 5.33). Como pode ser observado, o modelo apresentou adequado ( $R^2 = 0,9958$  e  $0,9966$ , respectivamente para os filmes de gelatina e colágeno) e o valor de  $n$  obtido foi de 1,4 (para ambos os filmes), cujo mecanismo de liberação corresponde ao transporte super caso-II e exibiu uma cinética próxima da ordem zero. O mecanismo de transporte super caso- II está relacionado com erosão, difusão e desestruturação polimérica (NNAMANI *et al.*, 2015; SONAWANE *et al.*, 2016). Assim, nos filmes estudados, ocorre desestruturação polimérica com uma difusão e liberação do fármaco de forma contínua e controlada, obedecendo a uma cinética de ordem zero.



**Figura 5.33** - Representação gráfica do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. (A) Filmes de gelatina. (B) Filmes de colágeno.

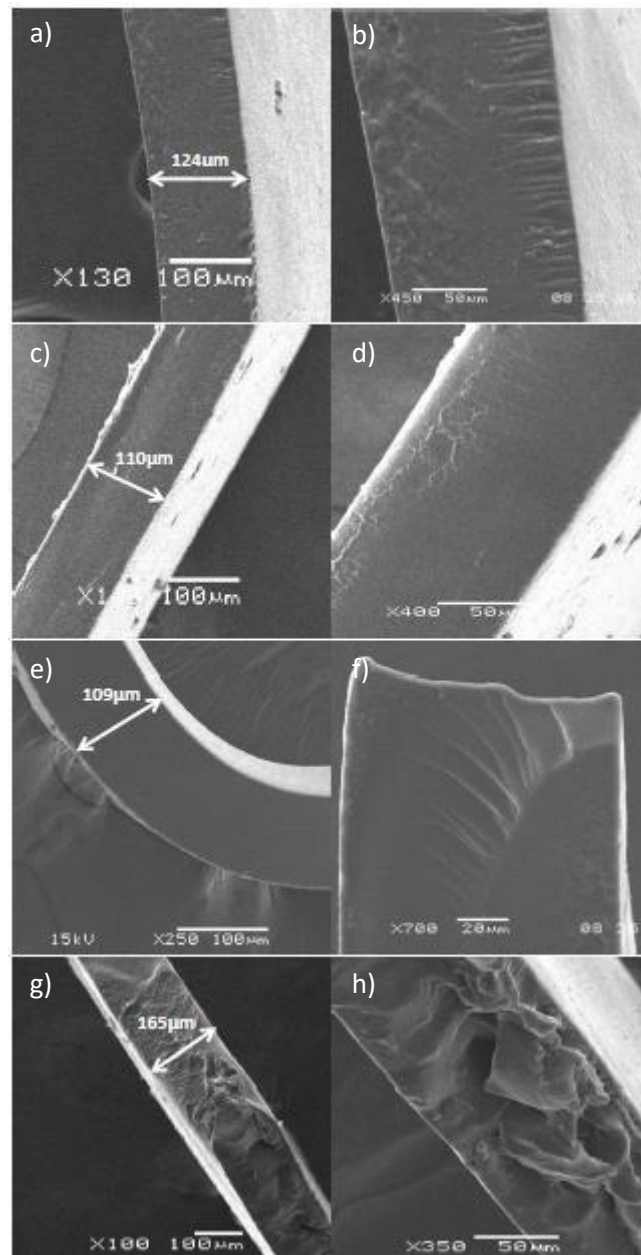
Além dos estudos de liberação mostrados acima, foi realizado também o estudo de liberação utilizando os filmes de colágeno e gelatina contendo as VP's carregadas com o adapaleno. Entretanto, como o período máximo de realização do estudo foi de 120 e 150 minutos para a gelatina e o colágeno, respectivamente, devido à rápida degradação dos filmes, não foi possível detectar a liberação do fármaco pelas vesículas. Comparando ao resultado mostrado no tópico 5.8.4, onde só foi possível detectar a liberação do fármaco pelas vesículas a partir de 12 horas de inserção no meio de liberação, é possível deduzir que o tempo de estudo, ou a técnica de análise selecionada para quantificação do AD, não foi suficiente para realizar tal detecção. Ao inserirmos as vesículas poliméricas contendo AD nos filmes de gelatina e colágeno, impomos duas barreiras a serem rompidas: a barreira polimérica da vesícula e a do filme. Assim, já seria esperada uma liberação ainda mais lenta do AD.

A quantidade de fármaco liberado pelo sistema produzido foi calculada a partir do teor encapsulado inicialmente obtido, utilizando as leituras adquiridas pela espectroscopia de UV-Vis

## 5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Também foram obtidas imagens da fratura criogênica dos filmes de colágeno puro e dos filmes de colágeno contendo adapaleno, sulfadiazina de prata e vesículas carregadas com o AD. A Figura 5.34 mostra imagens obtidas a partir dos filmes de colágeno, onde foi possível observar uma estrutura uniforme para a maioria dos filmes, exceto para o filme contendo as vesículas carregadas com o AD, que aparenta ter apresentado deformação plástica durante realização da fratura criogênica, já que o colágeno torna-se flexível rapidamente (GIL *et al.*, 2016b). O diâmetro médio dos filmes obtidos foi de  $127 \pm 26,24\mu\text{m}$ . Não foi observada segregação microscópica dos componentes adicionados na gelatina e colágeno.





**Figura 5.34** - Imagem MEV da superfície de fratura de filmes de colágeno: (a) e (b) puro; (c) e (d) contendo AD; (e) e (f) contendo SSD; (g) e (h) contendo SSD e VP's carregadas com AD.

## Capítulo 6: Conclusão

- ✓ Foi possível produzir nanopartículas carregadas com o Adapaleno e também sem o AD, utilizando-se o copolímero em bloco PS-PEO;
- ✓ As vesículas obtidas foram incorporadas em filmes de gelatina e colágeno;
- ✓ As caracterizações das vesículas realizadas por TEM e DLS permitiram observar a morfologia vesicular, bem como seu diâmetro, sua carga superficial e seu índice de polidispersão;
- ✓ Através da análise por FTIR foi possível verificar a ausência de resíduos do solvente 1,4-dioxano nas formulações preparadas;
- ✓ A análise termogravimétrica das vesículas permitiu constatar que os protocolos adotados na síntese dos filmes não ocasionam degradação das vesículas;
- ✓ A avaliação do teor de encapsulamento mostrou que houve perda de fármaco durante o processo de síntese das VP's, principalmente após a etapa de filtragem, ocasionando um teor de encapsulação considerado baixo, quando comparado às formulações presentes no mercado;
- ✓ O ensaio de liberação das vesículas carregadas com o fármaco apresentou um perfil de liberação constante durante o período em que foi avaliado, comprovando a sua capacidade de liberação do fármaco de forma lenta e controlada;
- ✓ Foram desenvolvidos filmes de gelatina e colágeno contendo as VP's, adicionando-se uma concentração de AD e SSD livres;
- ✓ O ensaio de liberação dos fármacos pelos filmes mostrou que estes são capazes de atuar como sistemas de liberação controlada;
- ✓ A determinação do pH de superfície dos filmes mostrou que há uma compatibilidade com o pH da pele garantindo uma menor probabilidade de crescimento de microrganismos e conseqüente infecção;
- ✓ A análise por MEV da superfície de fratura do filme de colágeno apresentou uma estrutura uniforme.

Tais resultados demonstram a capacidade das VP's e dos filmes de atuarem como SLC's para aplicação em queimaduras, já que apresentam a combinação de dois fármacos capazes de acelerar e melhorar o processo de regeneração do tecido, enquanto inibem os processos inflamatórios e infecciosos, com a vantagem de não ser necessária a sua remoção, já que o organismo absorve o colágeno e a gelatina.

## **Capítulo 7: Sugestões para Trabalhos Futuros**

O objetivo deste trabalho foi a síntese de vesículas contendo Adapaleno, para aplicação como sistema de liberação controlada.

Pretende-se futuramente: aperfeiçoar o processo de síntese das vesículas, buscando o aumento do teor de encapsulação do fármaco e a melhoria do IP; desenvolver filmes de colágeno e gelatina que apresentem maior elasticidade e resistência, melhorando o período de permanência em feridas, proporcionando assim a liberação do princípio ativo de forma mais controlada e gradual; e em seguida, a realização de testes de citotoxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. J.; ADAMS, S.; ATKINS, D.; BUTLER, M. F.; FURZELAND, S. Impact of mechanism of formation on encapsulation in block copolymer vesicles. **Journal of controlled release**, v. 128, n. 2, p. 165–70, 4 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436325>>. Acesso em: 31 out. 2014.

ALI, N.; CHIPARA, D.; LOZANO, K.; HINTHORNE, J.; CHIPARA, M. Polyethylene Oxide – Fullerene Nanocomposites. **Applied Surface Science**, v. 390, n. 1, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433216326083>>.

ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From basic science to basic skin care. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 93, n. 3, p. 261–267, 2013.

ALTINYAZAR, H. C.; KOCA, R.; TEKIN, N. S.; EŞTÜRK, E. Adapalene vs. metronidazole gel for the treatment of rosacea. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 3, p. 252–255, 2005.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.

AUST, M. C.; KNOBLOCH, K.; REIMERS, K.; REDEKER, J.; IPAKTCHI, R.; ALTINTAS, M. A.; GOHRITZ, A.; SCHWAIGER, N.; VOGT, P. M. Percutaneous collagen induction therapy: An alternative treatment for burn scars. **Burns**, v. 36, n. 6, p. 836–843, 2010.

BANSAL, S.; KASHYAP, C. A comparative review on vesicular drug delivery system and stability issues. **Ijrpc**, v. 2, n. 3, p. 704–713, 2012. Disponível em: <<http://www.ijrpc.com/files/17-2114.pdf>>.

BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1st. ed. [s.l: s.n.]

BAŞAK, P. Y.; EROGLU, E.; ALTUNTAS, I.; AGALAR, F.; BAŞAK, K.; SUTCU, R. Comparison of the effects of tretinoin, adapalene and collagenase in an experimental model of wound healing. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 2, p. 145–148, 2002.

BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymer thermodynamics: theory and experiment. **Annual review of physical chemistry**, v. 41, n. 1, p. 525–557, 1990.

Disponível em:

<<http://physchem.annualreviews.org/cgi/doi/10.1146/annurev.physchem.41.1.525>>.

BENNET, D.; KIM, S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. In: **Nanotechnology and Nanomaterial: Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l: s.n.]p. 257–310.

CAON, T.; PORTO, L. C.; GRANADA, A.; PIAZZON, M.; ANTONIO, M.; SILVA, S.; MARIA, C.; SIMÕES, O.; BORSALI, R.; SOLDI, V. European Journal of Pharmaceutical Sciences Chitosan-decorated polystyrene- b -poly ( acrylic acid ) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 165–172, 2013.

CASTANGIA, I.; MANCA, M. L.; CADDEO, C.; MAXIA, A.; MURGIA, S.; PONS, R.; DEMURTAS, D.; PANDO, D.; FALCONIERI, D.; PERIS, J. E.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Faceted phospholipid vesicles tailored for the delivery of Santolina insularis essential oil to the skin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 185–193, 2015. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515003239>>.

CHANG, T. **Synthesis of amphilic block copolymers for study of cellular interaction and uptake**. 2012. University of New South Wales, Sydney - Australia, 2012.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, n. 8, p. 821–833, 2014.

CHIEFFI, G.; DI GIROLAMO, R.; ARONNE, A.; PERNICE, P.; FANELLI, E.; LAZZARI,

M.; DE ROSA, C.; AURIEMMA, F. Rapid-flux-solvent-atmosphere method for tailoring the morphology of titania substrates over a large area via direct self-assembly of block copolymers. **RSC Advances**, v. 4, n. 32, p. 16721, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c4ra00110a>>.

CHOUCAIR, A.; LAVIGUEUR, C.; EISENBERG, A. Polystyrene- b -poly(acrylic acid) Vesicle Size Control Using Solution Properties and Hydrophilic Block Length. **Langmuir**, v. 20, n. 10, p. 3894–3900, 2004. Disponível em: <<http://0-pubs.acs.org.pugwash.lib.warwick.ac.uk/doi/full/10.1021/la035924p>>.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. **Modeling and comparison of dissolution profiles** **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2001. .

CUNLIFFE, W. J.; HOLLAND, D. B.; JEREMY, A. Comedone formation: Etiology, clinical presentation, and treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 367–374, 2004.

CZERNIELEWSKI, J.; MICHEL, S.; BOUCLIER, M.; BAKER, M. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. **Jeadv**, v. 15, p. 5–12, 2001.

DARLING, S. B. Directing the self-assembly of block copolymers. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 10, p. 1152–1204, 2007.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524422>>.

DE CAMPOS PESETO, D.; CARMONA, E. V.; SILVA, K. C. Da; GUEDES, F. R. V.; HUMMEL FILHO, F.; MARTINEZ, N. P.; PEREIRA, J. A.; ROCHA, T.; PRIOLLI, D. G. Effects of tretinoin on wound healing in aged skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 2, p. 411–417, 2016.

DEMATTE, M. F.; GEMPERLI, R.; SALLES, A. G.; DOLHNIKOFF, M.; LANÇAS, T.;

HILÁ, P.; SALDIVA, N.; FERREIRA, M. C. Mechanical evaluation of the resistance and elastance of post-burn scars after topical treatment with tretinoin. **Clinics**, v. 66, n. 11, p. 1949–1954, 2011.

DI MARZIO, L.; ESPOSITO, S.; RINALDI, F.; MARIANECCI, C.; CARAFA, M. Polysorbate 20 vesicles as oral delivery system: In vitro characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 200–206, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.036>>.

DISCHER, B. M. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1143–1146, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5417.1143>>.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 1–11, 2006.

DOWLING, A. P. Development of Nanotechnologies. **Materials Today**, v. 7, n. 12, p. 30–35, 2004.

DU, J.; ARMES, S. P. Preparation of biocompatible zwitterionic block copolymer vesicles by direct dissolution in water and subsequent silicification within their membranes. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 16, p. 9564–70, 18 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572508>>. Acesso em: 31 out. 2014.

DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3544–3561, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/B905635A>>.

EDWARDS, J. Hydrogels and their potential uses in burn wound management. **The British Journal of Nursing**, v. 19, n. Sup4, p. S12–S16, 2010.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. a. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of controlled release** :

**official journal of the Controlled Release Society**, v. 157, n. 2, p. 168–82, 30 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839127>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

FERREIRA, A. G. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de  $\beta$  ciclodextrina- b -poli (  $\epsilon$  -caprolactona ) e florianópolis**. 2015. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

FIRDESSA, R.; OELSCHLAEGER, T. A.; MOLL, H. Identification of multiple cellular uptake pathways of polystyrene nanoparticles and factors affecting the uptake: Relevance for drug delivery systems. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 8–9, p. 323–337, 2014.

FRIESS, W. Collagen - Biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 113–136, 1998.

FROST, R. L.; KLOPROGGE, J. T. Vibrational spectroscopy of ferruginous smectite and nontronite. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 56, n. 11, p. 2177–2189, 2000.

GIACOMELLI, C.; LE MEN, L.; BORSALI, R.; LAI-KEE-HIM, J.; BRISSON, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. Phosphorylcholine-based pH-responsive diblock copolymer micelles as drug delivery vehicles: Light scattering, electron microscopy and fluorescence experiments. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 817–828, 2006.

GIL, C. S. B.; GIL, V. S. B.; CARVALHO, S. M.; SILVA, G. R.; MAGALHÃES, J. T.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, A.; MANSUR, H. S.; PATRICIO, P. S. O.; OLIVEIRA, L. C. A. Recycled collagen films as biomaterials for controlled drug delivery. **New J. Chem.**, v. 40, n. 10, p. 8502–8510, 2016a. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6NJ00674D>>.

GIL, C. S. B.; PATRICIO, P. S.; OLIVEIRA, L. C.; ORÉFICE, R. L. Improved self-healing properties of collagen using polyurethane microcapsules containing reactive diisocyanate. **Polymer International**, v. 65, n. 6, p. 721–727, 2016b.



GIL, V. S. B. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO COM USO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SULFADIAZINA DE PRATA.** [s.l: s.n.].

GLAGOLA, C. P.; MICELI, L. M.; MILCHAK, M. A.; HALLE, E. H.; LOGAN, J. L. Polystyrene-poly(ethylene oxide) diblock copolymer: The effect of polystyrene and spreading concentration at the air/water interface. **Langmuir**, v. 28, n. 11, p. 5048–5058, 2012.

GUO, C.; KHENGAR, R. H.; SUN, M.; WANG, Z.; FAN, A.; ZHAO, Y. Acid-responsive polymeric nanocarriers for topical adapalene delivery. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 11, p. 3051–9, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84932116450&partnerID=tZOtx3y1>>.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57–64, 2008.

HARDE, H.; AGRAWAL, A. K.; KATARIYA, M.; KALE, D.; JAIN, S. Development of a topical adapalene-solid lipid nanoparticle loaded gel with enhanced efficacy and improved skin tolerability. **RSC Adv.**, v. 5, n. 55, p. 43917–43929, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA06047H>>.

HERANE, M. I.; ORLANDI, C.; ZEGPI, E.; VALDÉS, P.; ANCIĆ, X. Clinical efficacy of adapalene (differin®) 0.3% gel in Chilean women with cutaneous photoaging. **The Journal of dermatological treatment**, v. 23, n. 1, p. 57–64, 2012. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/09546634.2011.631981%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007702>>.

HU, J.; KOLEVA, D. a.; MA, Y.; SCHLANGEN, E.; PETROV, P.; VAN BREUGEL, K. **The influence of admixed micelles on the microstructural properties and global performance of cement-based materials** **Cement and Concrete Research**, 2012a. .

HU, J.; KOLEVA, D. a.; PETROV, P.; VAN BREUGEL, K. Polymeric vesicles for

corrosion control in reinforced mortar: Electrochemical behavior, steel surface analysis and bulk matrix properties. **Corrosion Science**, v. 65, p. 414–430, dez. 2012b.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010938X12003988>>.

Acesso em: 31 out. 2014.

JAIN, A. K.; JAIN, A.; GARG, N. K.; AGARWAL, A.; JAIN, A.; JAIN, S. A.; TYAGI, R. K.; JAIN, R. K.; AGRAWAL, H.; AGRAWAL, G. P. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 222–229, 2014.

KANAPATHIPILLAI, M. **Synthesis and characterization of smart block copolymers for biomineralization and biomedical applications Vasa**, 2008. . Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>.

KAWASHIMA, M.; HARADA, S.; LOESCHE, C.; MIYACHI, Y. Adapalene gel 0.1% is effective and safe for Japanese patients with acne vulgaris: A randomized, multicenter, investigator-blinded, controlled study. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, n. 3, p. 241–248, 2008.

KITA-TOKARCZYK, K.; GRUMELARD, J.; HAEFELE, T.; MEIER, W. Block copolymer vesicles—using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. **Polymer**, v. 46, n. 11, p. 3540–3563, maio 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105002430>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

KLAIKHERD, A.; NAGAMANI, C.; THAYUMANAVAN, S. Multi-Stimuli Sensitive Amphilic Block Copolymer Assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4830–4838, 2009.

KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, a. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n. 1, p. 23–44, dez. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X01002198>>.

LANGER, R. S.; WEISSLEDER, R. Nanotechnology. **Scientific Discovery and The Future of Medicine**, v. 313, n. 2, p. 2014–2015, 2015.

LATEEF, H.; ASLAM, M. N.; STEVENS, M. J.; VARANI, J. Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds. **Archives of Dermatological Research**, v. 297, n. 2, p. 75–83, 2005.

LEE, J. S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery : Design , formation and characterization. **Journal of controlled release**, v. 161, p. 473–483, 2012.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259–269, 2007.

LI, D.; LI, C.; WAN, G.; HOU, W. Self-assembled vesicles of amphiphilic poly(dimethylsiloxane)-b-poly(ethylene glycol) copolymer as nanotanks for hydrophobic drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 1–8, 2010.

LOGAN, J. **Polystyrene-block-poly(ethylene oxide) stars: surface films at the air/water interface**. 2005. University of Florida, 2005.

LU, T.; TEN HAGEN, T. Homogeneous crystal grain formation in DPPC-DSPC based thermosensitive liposomes determines content release kinetics. **J Control Release**, v. 247, p. 64–72, 2017.

LUONG, T. Q.; VERMA, P. K.; MITRA, R. K.; HAVENITH, M. Onset of hydrogen bonded collective network of water in 1,4-dioxane. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 50, p. 14462–14469, 2011.

MA, G.; CHENG, Q. Manipulating FRET with polymeric vesicles: Development of a -mix-and-detect type fluorescence sensor for bacterial toxin. **Langmuir**, v. 22, n. 16, p. 6743–6745, 2006.

MA, L.; EISENBERG, A. Relationship between wall thickness and size in block copolymer vesicles. **Langmuir**, v. 25, n. 24, p. 13730–13736, 2009.

MACY, R. Alcoholes, fenoles y éteres. In: REVERTÉ (Ed.). **Química Orgánica Simplificada**. [s.l: s.n.]p. 265–280.

MAI, Y.; EISENBERG, A. Controlled incorporation of particles into the central portion of block copolymer rods and micelles. **Macromolecules**, v. 44, n. 8, p. 3179–3183, 2011.

MANSUR, H. S. Técnicas de Caracterização de Materiais. In: **Biomateriais - Fundamentos e Aplicações**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. p. 185–235.

MILNE, S. D.; CONNOLLY, P. The influence of different dressings on the pH of the wound environment. **Journal of wound care**, v. 23, n. 2, p. 53–4, 56–7, 2014.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526080>>.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine : current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 2016.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. **Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. Saudi pharmaceutical journal : SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, 2011. .  
Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016411000302>>.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVALE, V.; KORTING, H. C.; ROEDER, A.; WEINDL, G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical interventions in aging**, v. 1, n. 4, p. 327–348, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. **1,4-Dioxane**.  
Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C123911&Mask=80#IR-Spec>>. Acesso em: 1 dez. 2016.

NNAMANI, P. O.; UGWU, A. A.; IBEZIM, E. C.; KENECHUKWU, F. C.; OGBONNA, J.

D. N.; OBITTE, N. C.; CHIME, S. A.; ATTAMA, A. A. Sustained-release liquisolid compacts of lumenfantrine-artemether as alternate-day-regimen for malaria treatment to improve patient compliance. In: NSTI: Advanced Materials - TechConnect Briefs 2015, **Anais...**2015.

NUNES, P. S. **Efeito de membranas de gelatina contendo ácido úsnico em queimaduras utilizando modelo suíno**. 2013. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JNIOR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R. R.; DANTAS, M. D. M.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; SOUZA, J. C. C.; SERAFINI, M. R.; QUITANS-JR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAJO, A. A. S. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 9, 2011.

NUNES, P. S.; RABELO, A. S.; SOUZA, J. C. C. de; SANTANA, B. V.; DA SILVA, T. M. M.; SERAFINI, M. R.; DOS PASSOS MENEZES, P.; DOS SANTOS LIMA, B.; CARDOSO, J. C.; ALVES, J. C. S.; FRANK, L. A.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; PINHEIRO, M. S.; DE ALBUQUERQUE, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. de S. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 473–482, 2016.

OCKER, M.; HEROLD, C.; GANSLMAYER, M.; HAHN, E. G.; SCHUPPAN, D. The synthetic retinoid adapalene inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells in vitro. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 107, n. 3, p. 453–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506747>>.

OCKER, M.; HEROLD, C.; GANSLMAYER, M.; ZOPF, S.; HAHN, E. G.; SCHUPPAN, D. Potentiated anticancer effects on hepatoma cells by the retinoid adapalene. **Cancer Letters**, v. 208, n. 1, p. 51–58, 2004.

ORÉFICE, R. L. Materiais Poliméricos - Ciência e Aplicação como Biomateriais. In: CULTURA MÉDICA (Ed.). **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1st. ed. [s.l.:

s.n.]p. 552.

PHILLIPS, D.; PYGALL, S.; COOPER, V.; MANN, J. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 11, p. 1549–59, 2012.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447–451, 2001.

PORTO, L. C. **Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um oligo / polissacarídeo**. 2011. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

PURNA, S. K.; BABU, M. Collagen based dressings--a review. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 26, n. 1, p. 54–62, 2000.

RAMEZANLI, T.; ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 143–152, 2017. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963416301162>>.

RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D.; KATSAMBAS, A. D. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clinics in Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 408–411, 2004.

RIJCKEN, C. J. F.; SOGA, O.; HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. van. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 131–148, 2007.

RIPPKE, F.; SCHREINER, V.; DOERING, T.; MAIBACH, H. I. Stratum Corneum pH in Atopic Dermatitis Impact on Skin Barrier Function and Colonization with Staphylococcus Aureus. **Clinics in Dermatology**, v. 5, n. 4, p. 217–223, 2004.

RIPPKE, F.; SCHREINER, V.; SCHWANITZ, H.; AG, B. The Acidic Milieu of the Horny Layer New Findings on the Physiology and Pathophysiology of Skin pH. **Clinics in Dermatology**, v. 3, n. 4, p. 261–272, 2002.

ROSSI, R.; DIAS, C.; DONATO, E.; MARTINS, L.; BERGOLD, A.; FROEHLICH, P. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 119–24, 2007.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1595–1611, 2003.

SHAN, Y. H.; PENG, L. H.; LIU, X.; CHEN, X.; XIONG, J.; GAO, J. Q. Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 291–301, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.067>>.

SHARPE, J. R.; BOOTH, S.; JUBIN, K.; JORDAN, N. R.; LAWRENCE-WATT, D. J.; DHEANSA, B. S. Progression of wound pH during the course of healing in burns. **Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association**, v. 34, n. 3, p. e201-8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128128>>.

SHI, S.; PENG, X.; LIU, T.; CHEN, Y.-N.; HE, C.; WANG, H. Facile preparation of hydrogen-bonded supramolecular polyvinyl alcohol-glycerol gels with excellent thermoplasticity and mechanical properties. **Polymer**, v. 111, p. 168–176, 2017.

SHI, T. W.; REN, X. K.; YU, H. X.; TANG, Y. B. Roles of adapalene in the treatment of pityriasis versicolor. **Dermatology**, v. 224, n. 2, p. 184–188, 2012.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 929–958, 2010.

SHROOT, B.; MICHEL, S. Pharmacology and chemistry of adapalene. **Journal of the**

**American Academy of Dermatology**, v. 36, n. 6 Pt 2, p. S96–S103, 1997.

SILVA, G. H. da. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos nanoparticulados de ps- b -paa com superfície modificada com derivados de quitosana para a Florianópolis**. 2015. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2015.

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: In vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 1, p. 123–136, 2005.

SONAWANE, S. J.; KALHAPURE, R. S.; RAMBHAROSE, S.; MOCKTAR, C.; VEPURI, S. B.; SOLIMAN, M.; GOVENDER, T. Ultra-small lipid-dendrimer hybrid nanoparticles as a promising strategy for antibiotic delivery: In vitro and in silico studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 504, n. 1–2, p. 1–10, 2016.

SOO, P. L. I. M.; EISENBERG, a D. I. Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution. **Journal of polymer science: Part B: polymer physics**, v. 42, p. 923–938, 2004.

SRIKANTH, P.; RAJU, N.; RAJA, S. W.; RAJ, S. B. A review on oral controlled drug delivery. **International Journal of Advanced Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 51–58, 2013.

SWEETMAN, S. C. **Martindale - guia completo de consulta farmacoterapeutica**. 2nd. ed. [s.l: s.n.]

TAHERI, A.; TUCHAYI, S. M.; ALINIA, H.; ORSCHELN, C. S.; MANSOORI, P.; FELDMAN, S. R. Topical clobetasol in conjunction with topical tretinoin is effective in preventing scar formation after superficial partial-thickness burn ulcers of the skin: A retrospective study. **J Dermatolog. Treat.**, v. 26, n. 4, p. 361–4, 2015.

THET, N. T.; HONG, S. H.; MARSHALL, S.; LAABEI, M.; TOBY, a.; JENKINS, a. Visible, colorimetric dissemination between pathogenic strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using fluorescent dye containing lipid vesicles.



**Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 538–543, 2013. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566312006252>>.

TOM, W. L.; PENG, D. H.; ALLAEI, A.; HSU, D.; HATA, T. R. The effect of short-contact topical tretinoin therapy for foot ulcers in patients with diabetes. **Archives of dermatology**, v. 141, n. 11, p. 1373–1377, 2005.

TUMMALAPALLI, M.; BERTHET, M.; VERRIER, B.; DEOPURA, B. L.; ALAM, M. S.; GUPTA, B. Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1–2, p. 234–245, 2016.

UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–3198, nov. 1999. Disponível em:  
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr940351u>>.

**USP - Revision Bulletin Oficial**. Disponível em:  
<[http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/adapalene\\_description\\_and\\_solubility.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/adapalene_description_and_solubility.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2017.

VENKATARAMAN, S.; HEDRICK, J. L.; ONG, Z. Y.; YANG, C.; EE, P. L. R.; HAMMOND, P. T.; YANG, Y. Y. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 14–15, p. 1228–46, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777633>>. Acesso em: 10 set. 2014.

VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. [s.l: s.n.].

WANG, J.; CHEN, G. X.; SUN, J.; LI, Q. Selective self-assembly of surface-functionalized fullerenes in PS-PEO on different substrates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 12, p. 2824–2830, 2011.

WANG, N.; LIAO, Y.; DENG, R.; LIU, S.; CAO, N.; TAN, B.; ZHU, J.; XIE, X. Polymer–

inorganic hybrid microparticles with hierarchical structures formed by interfacial instabilities of emulsion droplets. **Soft Matter**, v. 8, n. 9, p. 2697, 2012a. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm06874e>>.

WANG, T.; ZHU, X. K.; XUE, X. T.; WU, D. Y. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 75–83, 2012b.

WU, S.; WANG, L.; KROEGER, A.; WU, Y.; ZHANG, Q.; BUBECK, C. Block copolymers of PS-*b*-PEO co-assembled with azobenzene-containing homopolymers and their photoresponsive properties. **Soft Matter**, v. 7, n. 24, p. 11535–11545, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C1SM06316B>>.

YANG, C.; LIU, S. Q.; VENKATARAMAN, S.; GAO, S. J.; KE, X.; CHIA, X. T.; HEDRICK, J. L.; YANG, Y. Y. Structure-directing star-shaped block copolymers Supramolecular. **Journal of controlled release**, p. 93–105, 2015.

YOSHINO, Y.; OHTSUKA, M.; KAWAGUCHI, M.; SAKAI, K.; HASHIMOTO, A.; HAYASHI, M.; MADOKORO, N.; ASANO, Y.; ABE, M.; ISHII, T.; ISEI, T.; ITO, T.; INOUE, Y.; IMAFUKU, S.; IRISAWA, R.; OHTSUKA, M.; OGAWA, F.; KADONO, T.; KAWAKAMI, T.; KUKINO, R.; KONO, T.; KODERA, M.; TAKAHARA, M.; TANIOKA, M.; NAKANISHI, T.; NAKAMURA, Y.; HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.; FUJIWARA, H.; MAEKAWA, T.; MATSUO, K.; YAMASAKI, O.; LE PAVOUX, A.; TACHIBANA, T.; IHN, H. The wound/burn guidelines ??? 6: Guidelines for the management of burns. **Journal of Dermatology**, v. 43, n. 9, p. 989–1010, 2016.

YU, K.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies in Aqueous Solutions of Aggregates of Polystyrene- block -poly(ethylene oxide) Diblock Copolymers. **Macromolecules**, v. 29, n. 19, p. 6359–6361, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ma960381u>>.

ZHANG, Y.; PAN, M.; LIU, C.; HUANG, J. Preparation of Amphiphilic Ternary Block Copolymers with PEO as the Middle Block and the Effect of PEO Position on the Glass Transition Temperature (T<sub>g</sub>) of Copolymers. **Wiley InterScience**, v. 46, n. 8, p. 2624–2631, 2007.

ZÓTTOWSKA, K.; PIOTROWSKA, U.; OLEDZKA, E.; KURAS, M.; ZGADZAI, A.; SOBCZAK, M. Biodegradable Poly(ester-urethane) Carriers Exhibiting Controlled Release of Epirubicin. **Pharmaceutical research**, v. 34, n. 4, p. 780–792, 2017.