



CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
Curso de Mestrado em Nanociências

DANIELLE ARAUJO AGARRAYÚA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES
CONTENDO NANOCÁPSULAS DE SULFADIAZINA DE PRATA

Santa Maria, RS

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLE ARAUJO AGARRAYÚA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE
SUSPENSÕES CONTENDO NANOCÁPSULAS DE
SULFADIAZINA DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências do Centro Universitário Franciscano de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientador(a): Prof^(a)Dr^(a) **Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel**

Santa Maria, RS

2010

Ficha Catalográfica

A261a

Agarrayúa, Danielle Araujo

Avaliação microbiológica e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de sulfadiazina de prata / Danielle Araujo Agarrayúa; orientação Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel. – Santa Maria, 2010.

86f. : il.

Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano.

1. Sulfadiazina de prata. 2. Nanocápsulas. 3. Validação metodológica. 4. Ensaio microbiológico I. Hoelzel, Solange Cristina da Silva Martins. II. Título.

CDU 615.262.1:62-181.4

ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

Mestrado em Nanociências

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO-ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO:

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES
CONTENDO NANOCÁPSULAS DE SULFADIAZINA DE PRATA

Elaborada por:

DANIELLE ARAUJO AGARRAYÚA

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel - UNIFRA



Prof. Dr. Helmoz Roseniaim Appelt - UNIFRA



Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick - UFSM

Santa Maria, 24 de Junho de 2010.



Biblioteca

Termo de autorização

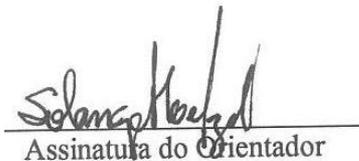
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Acadêmico em Nanociências.

Título da Dissertação: Avaliação microbiológica e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de sulfadiazina de prata.

Orientador: Solange Cristina Martins da Silva Hoelzel

Eu, Danielle Araujo Agarrayúa, R. G. nº 6065270181, autor da Dissertação acima citada, autorizo o Centro Universitário Franciscano – UNIFRA- a disponibilizar, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, o documento, em meio eletrônico, na Rede Mundial de Computadores (Internet) para fins de leitura e/ou impressão e para divulgação da produção científica gerada na Instituição, a partir desta data.


Assinatura do Autor


Assinatura do Orientador

SANTA MARIA

Local

26/07/2010.

Data

Dedico esta dissertação a minha família e aos meus amigos.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Solange Hoelzel por sua orientação dedicada, pelo conhecimento compartilhado e pela paciência comigo e com a minha dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Marta Palma Alves pela co-orientação, a qual foi de extrema importância para a realização dos trabalhos relacionados às suspensões de nanocápsulas.

À Prof^a. Sandra Cadore pelo auxílio durante a validação do método analítico.

À Prof^a. Dr^a. Renata Raffin pela contribuição prestada durante a discussão dos resultados obtidos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nanociências pela contribuição na minha formação profissional.

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, em especial, a Prof^a. Luciane, Prof. Marcos e ao Junior pela ajuda e apoio durante o mestrado.

As colegas e amigas do Laboratório de Nanotecnologia, pela amizade, companheirismo, paciência e auxílio prestados: Dani, Marcinha, Gabriela.

Aos meus colegas de mestrado e amigos Ivi e Jonas pela amizade e bons momentos de descontração.

A minha querida colega e amiga Isabel pela ajuda em todas as etapas da minha dissertação, pela força e amizade.

Às minhas grandes amigas Gabi, Jerusa e Maura pela amizade, carinho, pela motivação constante e pelo apoio incondicional.

Ao Lucas pelo amor, amizade, confiança e acima de tudo paciência.

À minha família, em especial aos meus pais Raul e Juci, pela formação que me proporcionaram, pelo apoio incondicional, confiança e amor.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a Deus por ter me dado a força e equilíbrio necessários para a realização desta dissertação.

RESUMO

Sulfadiazina de prata (SDAg), é o fármaco de escolha no tratamento tópico de infecções em queimaduras, possui um amplo espectro de ação e a incidência de resistência é consideravelmente menor do que a maioria dos antibióticos. Na presença de água a SDAg sofre hidrólise parcial com formação de sulfadiazina livre e prata, que tem mostrado ser previamente fotorreativa. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano da SDAg associada a nanocápsulas preparadas a partir de poli(ϵ -caprolactona), usando triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato de butilenoglicol como fase oleosa. As suspensões foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado e foram posteriormente caracterizadas através da determinação do teor de SDAg, taxas de associação, diâmetro médio das partículas, polidispersão e do potencial zeta das nanocápsulas contendo SDAg. Foi avaliada a influência dos óleos utilizados (Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico ou cocoato de butilenoglicol) sobre a caracterização físico-química das nanocápsulas. A atividade antimicrobiana das nanocápsulas contendo SDAg foi analisada contra o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853) pelo método de difusão em ágar. A técnica de doseamento da SDAg por CLAE foi validada em todos os parâmetros analisados e os resultados atenderam as especificações de linearidade, precisão e exatidão. As suspensões contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico apresentaram tamanho médio de 225 nm ($\pm 1,71$), potencial zeta de - 26 mV ($\pm 1,09$) e valores de pH de 5,6. Estas amostras apresentaram 100% de taxa de associação. Os valores do tamanho de partícula da suspensão contendo cocoato de butilenoglicol foram de 221,4 nm ($\pm 2,3$), o potencial zeta foi - 27,9 ($\pm 1,7$) e o pH 5,7. A suspensão preparada com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico apresentou teor de SDAg de 77 % e 97,96 %, determinada por CLAE e ensaio microbiológico, respectivamente, sendo maior quando comparada com a suspensão preparada com cocoato de butilenoglicol, 38,5 % e 87,26 %, demonstrando que o processo de extração da SDAg utilizado é mais eficiente para a suspensão de nanocápsula com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso. Através dos resultados, pode-se concluir que as suspensões contendo nanocápsulas de sulfadiazina de prata podem ser uma alternativa para a incorporação em formulações de uso tópico.

Palavras-chave: Sulfadiazina de prata, nanocápsulas, validação metodológica, ensaio microbiológico.

ABSTRACT

Silver sulfadiazine (SDAg), the drug of choice for topical treatment of infected burns, possesses a broad spectrum of action and the incidence of resistance is considerably lower than with most antibiotics. In the presence of water SDAg undergoes a partial hydrolysis with formation of free sulfadiazine and silver, which has been previously shown to be photoreactive. This work presents as main objective evaluated the microbiological activity of SDAg associated with nanocapsules prepared from poly(ϵ -caprolactone), using capric and caprylic acid triglycerides and butyleneglicol cocoate as oily phase. The suspensions were prepared by interfacial deposition of pre-formed polymer and were characterized in term of SDAg contents, associated drug within the nanoparticles, pH, mean size of particles and zeta potentials of nanocapsules with SDAg, and evaluated the influence of the types of oils (capric and caprylic acid triglycerides and butyleneglicol cocoato) on nanocapsules physico-chemical characterization. The microbial activity of SDAg nanocapsules were analyzed against microorganism *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) by the method of agar diffusion. The dosage technique of SDAg in HPLC was validated in all analyzed parameters and the results obtained met the specifications for linearity, precision, and accuracy. The suspension containing capric and caprylic acid triglycerides presented average size of 225 nm ($\pm 1,71$), zeta potential of $- 26$ mV ($\pm 1,09$) and pH values of 5,6. This sample showed an 100 % of drug entrapment. The values size particle of the suspension containing butyleneglicol cocoato was 221,4 nm ($\pm 2,3$), zeta potential of $- 27,9$ mV ($\pm 1,7$) and pH 5,7. Suspension with miglyol[®] SDAg contents were 77 % and 97,96%, determined by HPLC and microbiological assay, respectively, being higher when compared with suspension butyleneglicol cocoato, 38,5 % e 87,26 % demonstrating that the extraction of SDAg used is more efficient for the nanocapsules suspension with capric and caprylic acid triglycerides as oil core. Through the results, it is possible to conclude that the silver sulfadiazine nanocapsule suspensions are an alternative for the corporation in topical formulations.

Key Words: Silver Sulfadiazine, nanocapsule, methodological validation, microbiological assay

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da sulfadiazina de prata (BORGES et al, 2005).....	28
FIGURA 2 – Representação gráfica de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (SCHAFFAZICK et al, 2003)	32
FIGURA 3 – Massa de poli(ϵ -caprolactona) após imersão no óleo cocoato de butilenoglicol por 45 dias (n = 3)	51
FIGURA 4 – Distribuição de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.....	53
FIGURA 5 – Distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.....	54
FIGURA 6 – Potencial zeta apresentado pelas suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.....	55
FIGURA 7 – Potencial zeta apresentado pelas suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.....	56
FIGURA 8 – Representação gráfica da curva analítica da sulfadiazina de prata.....	60
FIGURA 9 – Representação gráfica do teste de exatidão para a SDAg incorporada na suspensão de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico	63
FIGURA 10 – Representação gráfica do teste de exatidão para a SDAg incorporada na suspensão de nanocápsulas com cocoato de butilenoglicol	66
FIGURA 11 – Fase de definição das condições experimentais do ensaio microbiológico de difusão em ágar. Teste de diluições da amostra de nanocápsulas de sulfadiazina de prata nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ e 300 $\mu\text{g/mL}$ em placa contendo 20 mL de ágar Muller Hinton inoculada a 1% (v/v) com suspensão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ajustada a $25 \pm 2\%$ de transmitância.....	68
FIGURA 12 – Delineamento experimental 3x3 utilizado no ensaio de difusão em ágar. Camada de ágar inoculada com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 e diluições do padrão de sulfadiazina de prata nas concentrações teóricas de 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ e da amostra nas concentrações de 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$, em triplicada	69
FIGURA 13 – Curva padrão do ensaio microbiológico da sulfadiazina de prata	70

FIGURA 14 – Gráfico do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.....	71
FIGURA 15 – Gráfico do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Componentes utilizado na preparação das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata.....	41
TABELA 2 - Diluentes usados na extração da SDAg nas suspensões contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso	44
TABELA 3 - Curva analítica usada para a determinação da SDAg.....	46
TABELA 4 - Teste de recuperação da SDAg e suas concentrações teóricas finais.....	47
TABELA 5 - Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata durante 60 dias de análises (n = 3)	53
TABELA 6 - Testes de extração da SDAg a partir das suspensões de nanocápsulas	57
TABELA 7 - Valores referentes à construção da curva analítica da SDAg (n = 3).....	59
TABELA 8 - Análise de variância (ANOVA) correspondente às médias das áreas obtidas na determinação da curva de calibração da SDAg	60
TABELA 9 - Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação da SDAg nas suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (n = 6).....	61
TABELA 10 – Valores experimentais para o ensaio de precisão intermediária da SDAg incorporada em suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.....	62
TABELA 11 – Valores experimentais para o teste de exatidão da SDAg nas suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (n = 6)	63
TABELA 12 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação da SDAg nas suspensões de nanocápsulas como cocoato de butilenoglicol (n = 6).....	65
TABELA 13 – Valores experimentais para o testes de precisão intermediária da SDAg incorporada em suspensões de nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol	65
TABELA 14 – Valores experimentais para o teste de exatidão da SDAg nas suspensões de nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.....	66
TABELA 15 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a curva-padrão da solução de referência da SDAg.....	69

TABELA 16 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso	70
TABELA 17 – Resultado da determinação da potência da suspensão de nanocápsula com SDAg e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (n = 3).....	71
TABELA 18 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.....	72
TABELA 19 – Resultado da determinação da potência da suspensão de nanocápsula com SDAg e cocoato de butilenoglicol (n = 3).....	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

[]	-	Concentração
ACN	-	Acetonitrila
ANOVA	-	Análise de Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bg	-	Butilenoglicol
Ca	-	Concentração de sulfadiazina de prata encontrada na amostra adicionada ao padrão
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	-	Clinical Laboratory Standards Institute
Cna	-	Concentração de sulfadiazina de prata encontrada na amostra sem adição de padrão
Cp	-	Concentração de sulfadiazina de prata na solução padrão
CV	-	Coefficiente de variação
DCM	-	Diclorometano
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DP	-	Desvio padrão
DPa	-	Desvio padrão do intercepto com o eixo y
DPR	-	Desvio padrão relativo
FDA	-	Food and Drug Administration
FM	-	Fase Móvel
HA	-	Hidróxido de Amônio
IC	-	Inclinação média da curva padrão
ICH	-	Harmonized Drug Administration
LD	-	Limite de Detecção
LQ	-	Limite de Quantificação
NC	-	Nanocápsula
NCCLS	-	National Committee of Clinical Laboratory Standards

NC CO	-	Nanocápsula com Cocoato Bg [®]
NCCOBr	-	Nanocápsulas com Cocoato Bg [®] sem sulfadiazina de prata – Branco
NCMY	-	Nanocápsulas com Miglyol [®]
NCMYBr	-	Nanocápsulas com Miglyol [®] sem sulfadiazina de prata – Branco
PABA	-	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PCL	-	Poli (ϵ -caprolactona)
PLA	-	Poli (ácido láctico)
PLGA	-	Poli (ácido láctico co-ácido glicólico)
RNA	-	Ácido ribonucléico
SD	-	Sulfadiazina
SDAg	-	Sulfadiazina de Prata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 PELE.....	20
2.1.1 Epiderme.....	20
2.1.2 Derme	21
2.1.3 Hipoderme	21
2.2 QUEIMADURA.....	22
2.2.1 Queimadura de primeiro grau.....	23
2.2.2 Queimadura de segundo grau	23
2.2.3 Queimadura de terceiro grau	23
2.2.4 Queimadura de quarto grau	24
2.3 TERAPIA TÓPICA ANTIMICROBIANA.....	24
2.3.1 Uso de sulfadiazina de prata para o tratamento de queimaduras.....	25
2.3.2 Metodologias analíticas descritas para a sulfadiazina de prata	29
2.4 NANOTECNOLOGIA.....	31
2.4.1 Nanopartículas poliméricas	31
2.4.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas	34
2.4.3 Antimicrobianos e sistemas coloidais	36
2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 MATERIAIS	39
3.1.1 Matéria-prima, solventes e outros materiais.....	39
3.1.2 Equipamentos	40
3.2 METODOLOGIA.....	41
3.2.1 TESTE DO INCHAMENTO DO POLÍMERO	41
3.2.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO SDAg... 41	
3.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas de sulfadiazina de prata42	
3.2.3.1 Determinação do pH.....	42
3.2.3.2 Distribuição de tamanho de partículas e índice de polidispersão.....	42
3.2.3.3 Potencial zeta.....	43

3.2.3.4 Testes de extração do fármaco	43
3.2.3.5 Doseamento da SDAg nas suspensões coloidais	44
3.2.3.6 Determinação da taxa de associação	45
3.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DA SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	45
3.3.1 Linearidade (Curva de calibração)	45
3.3.2 Repetibilidade e Precisão	46
3.3.3 Exatidão	47
3.3.4 Especificidade.....	48
3.3.5 Limite de detecção.....	48
3.3.6 Limite de quantificação	48
3.4 MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR	49
3.4.1 Meio de cultura Ágar MacConkey	49
3.4.2 Meio de cultura Ágar Müeller Hinton	49
3.4.3 Solução padrão de sulfadiazina de prata.....	49
3.4.4 Solução amostra de nanocápsulas de sulfadiazina de prata.....	50
3.4.5 Microrganismo e padronização do inóculo	50
3.4.6 Procedimento do ensaio microbiológico	50
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICAS	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 TESTE DO INCHAMENTO DO POLIMERO	51
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES	52
4.2.1 Determinação do pH.....	52
4.2.2 Diâmetro das partículas e índice de polidispersão	53
4.2.3 Determinação do potencial zeta.....	55
4.2.4 Preparação das amostras.....	57
4.2.5 Taxa de associação	58
4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO TRIGLICERÍDEOS DE ÁCIDO CÁPRICO E CAPRÍLICO COMO NÚCLEO OLEOSO.....	58
4.3.1 Linearidade: Curva de calibração	59
4.3.2 Repetibilidade e Precisão	61
4.3.3 Exatidão	62

4.3.4 Especificidade.....	64
4.3.5 Limite de detecção e de quantificação.....	64
4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO COCOATO DE BUTILENOGLICOL COMO NÚCLEO OLEOSO.....	64
4.4.1 Repetibilidade e Precisão	64
4.4.2 Exatidão	66
4.4.3 Especificidade.....	67
4.5 ANÁLISE DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO.....	67
5 CONCLUSÃO.....	74
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

O controle de infecções hospitalares esta entre as maiores preocupações nas instituições de saúde. Nas unidades de queimados essa preocupação é essencial, já que os pacientes além de apresentarem lesões, possuem condições favoráveis para a proliferação bacteriana. A infecção bacteriana em queimaduras graves é a principal causa de doença e morte, e está relacionada com a idade do paciente e a porcentagem de área corpórea atingida pela queimadura (PEREIRA et al, 2002).

A terapia antimicrobiana tópica é essencial para obtenção de resultados ideais aos pacientes. Agentes antimicrobianos tópicos deverão ter atividade de amplo espectro, absorção sistêmica mínima, promover rápida cicatrização, boa penetração nas lesões, baixo custo e simplicidade (PATEL et al, 2008).

A sulfadiazina de prata (SDAg) representa um dos recursos amplamente utilizado no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro grau. Tornou-se o fármaco de escolha no tratamento de queimaduras devido ao amplo espectro de ação antimicrobiana sendo efetiva contra vários microrganismos, particularmente bactérias Gram-negativas (RAGONHA et al, 2005).

A terapia efetiva utilizando a dosagem atual de sulfadiazina de prata é um creme a 1% e exige várias aplicações diárias. Esta frequência interfere no processo de cicatrização, pois a troca de curativos torna o processo doloroso expondo os pacientes aos agentes infecciosos. Além do trauma e da dor, o creme de SDAg não é biodegradável e requer a remoção antes da reaplicação (LICHTENSTEIN; MARGALIT, 1995).

Nos últimos anos a procura por novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativa terapêutica mais eficiente, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (FORMARIZ et al, 2005).

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas esta sendo a estratégia mais promissora para aumentar a penetração de fármacos através da pele. Microemulsões, lipossomas e suspensões coloidais poliméricas têm sido estudadas como alternativa frente ao uso dos sistemas clássicos (ALVAREZ-ROMÁN et al, 2004).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1µm. O termo nanopartículas inclui nanocápsulas e nanoesferas. Nanocápsulas são estruturas vesiculares compostas de um invólucro de polímero

biodegradável ao redor de um núcleo oleoso, em que a substância ativa encontra-se dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica, sendo por isso, considerada como um sistema reservatório. Essas nanopartículas poliméricas além de serem promissores sistemas de liberação de fármacos, reduzem os efeitos colaterais de toxicidade, aumentam a estabilidade e solubilidade (SCHAFFAZICK et al, 2003; BHATTARAI et al, 2006).

Estudos já relataram a pouca solubilidade da sulfadiazina de prata em sistemas aquosos e efeitos específicos no íon do componente prata, que podem levar à dissociação da molécula Ag^+ e SD^- (LICHTENSTEIN; MARGALIT, 1995). Além disso, a exposição ao sol da pele tratada com SDAg deve ser evitada, pois esta pode levar à argiria, um escurecimento da pele causado pela deposição de prata elementar (KUNKELY; VOGLER, 2007).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e realizar a caracterização físico-química de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo sulfadiazina de prata (0,3 mg/mL), com diferentes componentes, através do método de nanoprecipitação e avaliar a potência das nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata pelo método microbiológico por difusão em ágar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PELE

A pele do homem, que corresponde a 15% de seu peso corporal, é um órgão que reveste e delimita o organismo, protegendo-o e interagindo com o meio exterior. Pela sua resistência e flexibilidade, determina a sua plasticidade. Caracteristicamente dinâmica, a pele apresenta alterações constantes, sendo dotada de grande capacidade renovadora e de reparação, e de certo grau de impermeabilidade. Tem como função maior e vital a conservação da homeostasia (termoregulação, controle hemodinâmico, produção e excreção de metabólitos). Desempenha, ainda, função sensorial, através dos elementos do sistema nervoso situado na derme, e função de defesa contra agressões físicas, químicas e biológicas, para a qual se destacam, pela sua importância, a ceratinização, o manto lipídico e o seu sistema imunológico (SODRÉ et al, 2006).

A pele pode ser dividida em três camadas: a epiderme (mais superficial), a derme (intermediária) e a hipoderme (mais profunda).

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada avascular da pele e a mais externa do corpo. Está separada da derme por sua última camada, a membrana basal ou germinativa, apoiada sobre as papilas dérmicas. Suas células são do tipo estratificada, de forma pavimentosa. Torna-se impermeável devido à sua camada superficial morta e queratinizada, denominada como extrato córneo, podendo suas células se apresentarem de forma compacta ou em disjunção. Dentre as suas inúmeras funções, conferem proteção ao organismo contra os agentes físico-químicos do ambiente e os microrganismos parasitas. Embora não apresente vasos sanguíneos, sua nutrição ocorre através da difusão de leitos presentes na derme. Quando submetida à pressão contínua, sofre espessamento, formando calos e calosidades, sendo esta uma forma de defesa aos atritos extrínsecos (BORGES et al, 2006).

2.1.2 Derme

A derme é uma camada de tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. É um tecido resistente e elástico que atua como protetor do corpo frente a lesões mecânicas e proporciona nutrientes à epiderme e aos anexos cutâneos. Esta, abriga os sistemas nervoso, linfático e sanguíneo e, rodeia os apêndices epidérmicos invaginados, isto é, os folículos pilosos com suas glândulas associadas e as glândulas sudoríparas écrinas. A derme é constituída por duas camadas a papilar e a reticular (MONTAGNER; CORRÊA, 2004).

É composta por um sistema integrado de estruturas fibrosas, filamentosas e amorfas. Fibroblastos, histiócitos, células dendríticas e mastócitos são suas células residentes, enquanto linfócitos, plasmócitos e outros elementos celulares do sangue são encontrados em número variável e de forma transitória. Sua interação com a derme é fundamental para a manutenção dos dois tecidos; ambos colaboram na formação da junção dermoepidérmica e dos anexos epidérmicos, assim como no processo de reparação da pele (SODRÉ et al, 2006).

2.1.3 Hipoderme

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo, que une a derme aos órgãos adjacentes. É esta a responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que se apóia. A hipoderme ou graxa cutânea é composta exclusivamente por tecido adiposo tendo participação no isolamento térmico, proporcionando proteção contra o frio e, também, proteção mecânica do organismo as pressões e traumatismos externos (MONTAGNER; CORRÊA, 2004). A anatomia topográfica da hipoderme, distingue-se em duas camadas que são separadas por uma fáscia superficial. A camada mais externa, que fica em contato com a derme, chama-se areolar, sendo composta por adipócitos globulares e volumosos, em disposição vertical, com vasos sanguíneos numerosos e delicados. Já a camada mais profunda, chamada de lamelar, apresenta células fusiformes, menores e com disposição horizontal, onde os vasos são de maior calibre (CHORILLI et al, 2007).

2.2 QUEIMADURA

Queimadura é uma lesão traumática que acomete os tecidos orgânicos. Nesse tipo de trauma há liberação de mediadores celulares e humorais que determinam alteração da permeabilidade capilar, metabólica e imunológica levando a distúrbios hidroeletrólíticos, desnutrição e infecção. Essas lesões podem variar de uma simples bolha ou flictena até formas mais graves, capazes de desencadear um grande número de respostas sistêmicas de acordo com a extensão e profundidade da lesão (AZEVEDO et al, 2002).

Existem vários agentes causadores de queimaduras, entre eles podemos encontrar queimaduras causadas por: agentes térmicos que pode ser caracterizado tanto pelo frio como pelo calor; agentes radiantes, como por exemplo, raio x e queimadura solar; agentes elétricos; agentes químicos, por exemplo, hidróxido de sódio entre outros. Agentes biológicos, como água viva. Independente do agente causador, a queimadura pode ser classificada de acordo com a camada da pele atingida, podendo ser de 1º, 2º e 3º graus (AZEVEDO et al, 2002).

O prognóstico e a gravidade de uma queimadura estão diretamente relacionados com a extensão da superfície corporal acometida e com a profundidade da ferida, existindo ainda alguns fatores que podem contribuir de maneira indireta como: a doença de base, o agente causal (fonte), a idade do paciente, e a existência de algum trauma associado à queimadura. Um conhecimento básico da anatomia e fisiologia da pele é necessário para compreender e avaliar a emergência da queimadura e os cuidados necessários (PEREIRA et al, 2002).

Em função da debilidade da pele, o organismo se encontra mais vulnerável aos agentes de agressão ambiental, permitindo assim, o estabelecimento e o crescimento de bactérias patogênicas, cuja proliferação em um ambiente favorável, poderá resultar em um quadro de sepse (infecção generalizada de todos os tecidos), que é responsável por um elevado índice de óbito em pacientes classificados como grandes queimados (PEREIRA et al, 2002).

Inicialmente a pele lesada torna-se estéril. Dependendo do agente da lesão, além da destruição da barreira epitelial, a microbiota residente da pele também é eliminada. Posteriormente, nas primeiras 48 horas, a ferida do queimado é colonizada por microrganismo da microbiota normal da pele, que são progressivamente substituídos, nos pacientes internados, por Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (PEREIRA et al, 2002).

Entender a classificação das feridas de queimadura é indispensável para seu tratamento.

2.2.1 Queimadura de primeiro grau

As queimaduras de primeiro grau são aquelas que resultam na formação de uma ferida superficial afetando apenas a epiderme, são caracterizadas por eritema local e possível formação de bolhas (PATEL et al, 2008). As queimaduras de primeiro grau, dependendo da extensão, geralmente evoluem rapidamente, regenerando-se em até cinco dias, sendo indicado o uso de creme hidratante local (FERREIRA et al, 2003).

2.2.2 Queimadura de segundo grau

A queimadura de segundo grau tem sido classificada como superficial ou profunda, e a sua evolução dependerá desta graduação de profundidade e da ocorrência ou não de complicações, sendo as infecções uma das causas mais frequentes de piora tanto no âmbito tópico quanto no sistêmico (FERREIRA et al, 2003). Nas queimaduras de segundo grau superficiais a epiderme é o principal elemento envolvido, e são caracterizadas pela formação de bolhas e escoriações cutâneas, apresentando cura em aproximadamente 14 dias. Em comparação, as queimaduras de segundo grau profundas podem apresentar uma coloração vermelha escura ou com uma base branca, afeta a derme e estruturas associadas ao nervo, podendo diminuir as sensações. O processo de cicatrização pode ser superior a 14 dias, podendo necessitar de processos cirúrgicos para tratar cicatrizes e seqüelas tardias (PATEL et al, 2008).

2.2.3 Queimadura de terceiro grau

Queimaduras que resultam na destruição total de ambas as camadas de pele são classificadas como queimaduras de terceiro grau ou queimaduras de espessura extensa (PATEL et al, 2008), apresentam-se esbranquiçadas ou negras, pouco dolorosas e secas. Na escolha do tratamento, deve-se considerar não só a profundidade da lesão, mas também a sua fase evolutiva (FERREIRA et al, 2003).

Devido às cicatrizes profundas associadas à espessura extensa das queimaduras, processos cirúrgicos envolvendo enxertos de pele são necessários (PATEL et al, 2008).

As queimaduras de segundo e terceiro graus terão que passar por um processo de desbridamento que consiste na retirada de tecidos desvitalizados. Esse processo poderá ser

demorado e necessitar de maior intervenção dependendo da profundidade e extensão da queimadura (FERREIRA et al, 2003).

2.2.4 Queimadura de quarto grau

As queimaduras de quarto grau são aquelas que normalmente envolvem músculos e ossos podendo exigir intervenção cirúrgica extensa, e em alguns casos levar a amputação do membro lesado (PATEL et al, 2008).

As lesões resultantes das queimaduras são isquêmicas como conseqüências da trombose causada pelo trauma. As queimaduras profundas apresentam trombose em todas as camadas da pele atingidas e a diminuição da oxigenação nesses tecidos dificulta o crescimento dos capilares e a cicatrização da ferida, pois todos os tecidos humanos requerem oxigênio para que se mantenham viáveis. Nas queimaduras profundas há uma grande quantidade de tecidos necróticos, o que facilita o desenvolvimento de infecções, pois esses tecidos fornecem nutrientes para as bactérias que requerem pouco oxigênio para sua sobrevivência, consumindo-o e diminuindo ainda mais a quantidade de oxigênio disponível para os tecidos (FERREIRA et al, 2003).

Há várias décadas, o avanço na gestão de feridas de queimaduras agudas, incluindo o desenvolvimento de agentes antimicrobianos de uso tópico, tem melhorado significativamente os resultados de lesões de queimadura. No entanto, a infecção continua sendo a principal causa de mortalidade em pacientes queimados (PATEL et al, 2008).

2. 3 TERAPIA TÓPICA ANTIMICROBIANA

Antimicrobianos tópicos são caracterizados como agentes bactericidas e bacteriostáticos aplicados diretamente na superfície da pele. As duas principais categorias de agentes antimicrobianos tópicos são anti-sépticos e antimicrobianos. Os anti-sépticos prontamente desinfetam superfícies, diminuindo a contagem bacteriana na pele intacta. Devido as suas propriedades irritantes, anti-sépticos não devem ser usados em feridas abertas e, em alguns casos, prolongam a cicatrização de feridas. Por outro lado, antibióticos tópicos são geralmente disponíveis em pomadas e são excelentes para o uso em feridas abertas. A função do veículo da pomada é manter a ferida úmida, promover a cicatrização e minimizar a aderência de bandagens (SPANN et al, 2004).

Formulações contendo antimicrobianos tópicos podem ser consideradas vantajosas sobre aqueles que contem homólogos sistêmicos porque liberam uma maior concentração do fármaco diretamente na área desejada e causam com, menos frequência, resistência bacteriana.

Vários estudos têm mostrado que o uso de antimicrobianos efetivos por via tópica é capaz de reduzir substancialmente a carga microbiana nas superfícies das feridas de queimaduras abertas reduzindo, assim, o risco de infecções. A seleção do antimicrobiano deve ser baseada na habilidade do agente em inibir os microrganismos existentes nas feridas da queimadura, inspecionando-se culturas bacterianas e monitorando as infecções nosocomiais adquiridas em unidades de queimados (CHURCH et al, 2006).

O objetivo da terapia tópica antimicrobiana é evitar o desenvolvimento de colonização superficial, incluindo os organismos resistentes a múltiplas drogas bem como infecções invasivas subseqüentes. Deve-se manter um equilíbrio na redução da infecção, evitando a citotoxicidade que prejudica a cicatrização de feridas, diminuir a perda de vapor d'água, evitar a dessecação de tecidos expostos e contribuir para o controle da dor (JAIN et al, 2009; PATEL et al, 2008; SHERIDAN, 2005).

A escolha efetiva e a aplicação de antimicrobianos tópicos requerem uma classificação correta das feridas da queimadura, adequada compreensão do processo de sepse das feridas e precisa identificação individual dos agentes patogênicos para cada paciente, bem como seu ambiente circundante (PATEL et al, 2008).

2.3.1 Uso da sulfadiazina de prata para o tratamento de queimaduras

A descoberta da atividade antibacteriana das sulfas foi oficializada em 1935 com a publicação do trabalho “Uma Contribuição à Quimioterapia das Infecções Bacterianas”, no qual foi descrita a atividade biológica da *p*-sulfamidocrisoidina (Prontosil Rubrum[®],1) pelo patologista e bacteriologista alemão Gerhardt Domagk. Esta substância havia sido sintetizada em 1932 por Mietsch e Klarer (Bayer), com base química clássica de corantes têxteis, especificadamente para ser testada como antibacteriano (BORGES et al, 2005). Constituíam a principal terapia antibacteriana antes do advento da penicilina. Apesar do aparecimento de inúmeros antibióticos, as sulfonamidas continuam tendo papel importante no tratamento de infecções de vários tipos (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2008).

As sulfonamidas são anti-infecciosos bacteriostáticos de amplo espectro. Como análogos estruturais do ácido *p*-aminobenzoico (PABA), inibem competitivamente a diidropteroato sintase, enzima bacteriana que catalisa a conversão do PABA a ácido diidrofólico. Isto impede a biosíntese do ácido diidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofólico metabolicamente ativo, co-fator para a biosíntese de purina, timidina e DNA. A consequência é a parada de crescimento das bactérias. No homem, o ácido diidrofólico é obtido do ácido fólico contido nos alimentos; por isso, as sulfonamidas não afetam as células de mamíferos (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2008).

A ação das sulfonamidas é antagonizada pelo PABA e seus derivados (como procaína, tetracaína) e pela presença de pus ou produtos de degradação dos tecidos, que fornecem as substâncias necessárias para o crescimento bacteriano (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2008).

A sulfadiazina de prata é um antimicrobiano tópico da classe das sulfonamidas. Foi desenvolvida por Charles L. Fox Jr., da Universidade de Columbia, Estados Unidos, por meio da associação de dois agentes antibacterianos já conhecidos e utilizados no tratamento de queimaduras – nitrato de prata e sulfadiazina – criando, assim, um composto extremamente efetivo contra infecções, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), em 1973. A partir de sua aprovação, rapidamente tornou-se o fármaco de escolha no tratamento de queimaduras devido ao amplo espectro de ação antimicrobiano (RAGONHA et al, 2005). A SDAg consiste na desprotonação da sulfadiazina SD^- sendo que a Ag^+ substitui o próton imida da sulfadiazina SD .

O aumento da resistência aos antibióticos é um problema sério, e neste contexto, íons de prata possuem um papel importante, pois há séculos é bem conhecido que os compostos com prata e a prata são bastante eficazes para a prevenção e tratamento de infecções em geral (KUNKELY; VOGLER, 2007). Os íons de prata ligam-se a ácidos nucleicos de microrganismos e liberam a sulfadiazina, prejudicando o metabolismo bacteriano (PATEL et al, 2008). Em estudos anteriores, o mecanismo de ação da SDAg contra *Pseudomonas aeruginosa*, foi investigado pelo uso de isótopos, Ag^{110} e S . SDAg³⁵. A SDAg foi dissociada e somente a molécula de prata foi encontrada nas células. Quantidades consideráveis de prata estavam ligadas, principalmente, em proteínas celulares e carboidratos. O DNA das células em fase log mostrou um grau de ligação de prata que variou com o tempo de incubação. Esses dados sugerem que a inibição do crescimento bacteriano resulta da interferência da ligação dos íons de prata ao DNA ao longo da cadeia helicoidal (MODAK; FOX, 1973). Portanto é

um inibidor da síntese de ácido fólico e das coenzimas de ácido fólico necessárias para a síntese de precursores de RNA e DNA (purinas e pirimidinas) (SPANN et al, 2004).

Sulfadiazina de prata tem atividade *in vitro* contra vários microrganismos patógenos de queimaduras incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Enterobacteriaceae* e *Candida albicans* (GEAR et al, 1997). A sua incidência (ou desenvolvimento) de resistência é consideravelmente menor do que a maioria dos antibióticos (LICHTENSTEIN; MARGALIT, 1995).

Em contato com a superfície da pele, a SDAg separa-se em sulfadiazina e prata, e estes são absorvidos na circulação sanguínea. Embora uma grande fração da prata absorvida é excretada nas fezes, aproximadamente 25% é excretada na urina. Em pacientes queimados tratados com SDAg, as concentrações plasmáticas atingem um máximo de 310 ng/mL, e na urina atinge um máximo de 588 e 1.100 µg/d, sugerindo que a excreção de prata, através dos rins representa uma das principais vias de eliminação de prata (IWASAKI et al, 1997).

Os efeitos colaterais da sulfadiazina de prata a 1% tem sido episódios de discreta leucopenia depois de poucos dias de uso, reações de hipersensibilidade, dermatite de contato alérgica, eritema multiforme, argiria sistêmica e argiria cutânea (FERREIRA et al, 2003; FISHER et al, 2003).

Argiria é um escurecimento irreversível da pele, no qual é causado pela deposição de prata elementar e, possivelmente, sulfato de prata. Na presença de água, a sulfadiazina de prata sofre uma hidrólise parcial com a formação de sulfadiazina livre, que tem mostrado ser previamente fotorreativa. Além disso, a irradiação de uma suspensão aquosa de SDAg leva, também, a fotorredução da Ag^+ , a prata elementar. Esta fotólise pode explicar a origem da argiria que pode ocorrer quando a SDAg em contato com a pele humana é exposta à luz solar (KUNKELY; VOGLER, 2007).

A terapia efetiva da SDAg exige várias aplicações diárias, esta frequência em si interfere na cura, pois as mudanças de curativos podem ser dolorosas para o paciente, causando trauma e exposição da ferida a novos agentes infecciosos. Além disso, o creme de sulfadiazina de prata não é biodegradável e requer a remoção antes da reaplicação (LICHTENSTEIN; MARGALIT, 1995).

O veículo de propileno glicol utilizado no creme possui uma tendência a formar pseudo-escaras que impedem a penetração da SDAg na queimadura, além de ser relativamente insolúvel em água, tornando-se difícil a remoção.

A sulfadiazina de prata (Figura 1), cuja fórmula é $C_{10}H_9AgN_4O_2S$, apresenta peso molecular de 357,14 g/mol. No Chemical Abstract System, é identificada pelo número 22199-08-2, sendo denominada benzenosulfonamida, 4-amino-*N*-2-pirimidinil1-monoprata (+1). É um pó cristalino de coloração branca a ligeiramente amarela clara. Praticamente insolúvel em água, etanol, éter e clorofórmio. Seu pH é entre 4,0 e 7,0. (THE INDEX MERCK, 2001, p. 1586; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

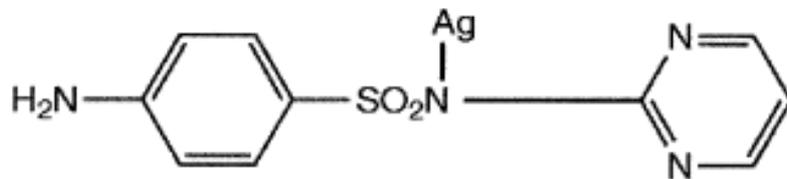


FIGURA 1 – Estrutura química da sulfadiazina de prata (BORGES et al, 2005).

Comercialmente, a sulfadiazina de prata está disponível para o uso tópico, na concentração de 1%, na forma de um creme branco, em um veículo de propileno glicol, inodoro ou em um gel hidrossolúvel, sendo encontrada, entre outras, sob as seguintes denominações Dermazine[®], Pratazine[®], Siglos[®], Ag derm[®], além da denominação genérica (RAGONHA et al 2005; SPANN et al, 2004).

Lichtensteins e Margalit (1995) desenvolveram lipossomas contendo sulfadiazina de prata, com altos níveis de encapsulamento e capacidade de liberação prolongada da SDAg, que pode agir como um bioadesivo quando aplicado topicamente.

Gear e colaboradores (1997) desenvolveram um novo gel, contendo sulfadiazina de prata, solúvel em água com aparentes vantagens sobre o creme de SDAg disponível comercialmente. Este novo gel com uma base solúvel em água pode ser facilmente removido da superfície das feridas. A fim de melhorar a aplicação tópica em pacientes queimados e minimizar a dor associada com a troca de curativos, Foroutan e colaboradores (2002) formularam um spray contendo sulfadiazina de prata, com a vantagem de promover uma aplicação tópica rápida e efetiva.

Nascimento e colaboradores (2009) também desenvolveram uma formulação a partir de um gel de quitosana, contendo sulfadiazina de prata a 1%, o qual mostrou uma maior evolução no processo de cicatrização.

Na presença de água a SDAg sofre uma hidrólise parcial com a formação de sulfadiazina livre, que tem mostrado ser previamente fotorreativa. Além disso, a radiação de uma suspensão aquosa de sulfadiazina de prata leva também a fotorredução de Ag^+ , a prata elementar (KUNKELY; VOGLER, 2007). A SDAg em pó é estável sob a luz, porém suspensões de SDAg em vários solventes que contenham pequenas quantidades de água, aparentemente, sofrem hidrólise ($2\text{SDAg} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ag}_2\text{O} + 2 \text{HSD}$), como é indicado pelo espectro do filtrado da suspensão. Esse espectro é essencialmente idêntico ao da sulfadiazina pura. Ao sofrer irradiação, esta solução gera mudanças espectrais. A primeira análise dessas mudanças pode indicar a ocorrência de uma fotohidrólise da sulfonamida: $\text{HSD} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2$ aminopirimidina + ácido sulfanílico. Contudo em um estudo recente revelou-se que a fotólise da SDH está associada com a extrusão de SO_2 e a formação concomitante de 4-(2-aminopirimidina-1(2H)-il)-anilina, como fotoprodutos (BOREEN et al, 2005).

A SDAg é um composto insolúvel, que consiste em uma rede polimérica. Duas cadeias formam uma estrutura de fita dupla que contém pares de cátions Ag^+ , em relativo contato estrito. A configuração dos íons de prata é uma bipirâmide trigonal distorcida. A prata é coordenada a um nitrogênio da amida desprotonada, para um oxigênio da sulfonila, e um nitrogênio da pirimidina da mesma cadeia. Além disso, cada prata é coordenada a um nitrogênio da pirimidina e mais um íon prata da cadeia vizinha (VOGLER; KUNKELY, 1989).

2.3.2 Metodologias analíticas descritas para a sulfadiazina de prata

A industrialização de produtos farmacêuticos e correlatos foi uma decorrência da evolução tecnológica deste século, envolvendo complexidade crescente até obtenção do produto acabado. Neste caso, as características que determinam a qualidade de um produto são eficácia terapêutica e segurança. Neste sentido, a escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para se proceder o controle de qualidade de uma substância ativa, como tal, ou sob uma determinada forma farmacêutica (OHARA et al, 2003).

Para fins de controle de qualidade, a Farmacopéia Americana preconiza que o creme de sulfadiazina de prata 1% deve conter teor de principio ativo entre 90% a 110%. As monografias de matéria-prima e do produto acabado descrevem técnica físico-química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que emprega a fase móvel composta de água,

acetonitrila e ácido fosfórico (900: 99: 1) a um fluxo de 2 mL/minuto, no modo isocrático. Utiliza detector UV ajustado a 254 nm de comprimento de onda e coluna cromatográfica C18 de 3,9 mm x 30 cm (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

Da mesma forma, outras técnicas físico-químicas oficiais para o controle de qualidade são descritas nas Farmacopéias Britânica (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008) e Européia (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002), as quais apresentam, em suas monografias técnicas semelhantes por CLAE para doseamento de sulfadiazina de prata matéria-prima e produto farmacêutico acabado.

Lichtenstein e Margalit (1995) desenvolveram um método espectrofotométrico que envolve DMSO/NH₃ como o melhor diluente para clarificação de suspensões lipossomais com absorção em 263 nm. Foroutan e colaboradores (2002) descrevem o método de cromatografia em camada delgada para doseamento da sulfadiazina de prata em uma formulação spray, com hidróxido de amônio como solução diluente e metanol, com separação em sílica gel F254, usando como eluente o clorofórmio-metanol-25% e amônia (70:40:10). Borges e colaboradores (2005) empregaram cromatografia gasosa, aplicando temperatura inicial da coluna de 80 °C e final de 210 °C e uma rampa de aquecimento por 6 minutos, após a síntese em escala semi-micro de sulfadiazina e sulfadiazina de prata.

Já Zadeh e Moghimi (2006) validaram um método por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando diferentes concentrações de sulfadiazina de prata em mistura de água, acetonitrila e ácido fosfórico (82:16:2) no estudo de permeação em escaras de queimaduras de terceiro grau.

Para a determinação de sulfadiazina de prata em fluídos biológicos, a literatura também reporta metodologias por espectrofotometria e espectrofotometria de absorção atômica (NASCIMENTO et al, 2009; IWASAKI et al, 1997).

Além das técnicas físico-químicas para o doseamento da SDAg, pode ser utilizado também o ensaio biológico por difusão em ágar para testes de suscetibilidade de microrganismos frente a sulfadiazina de prata (RAGONHA et al, 2005; GEAR et al, 1997; FOROUTAN et al, 2002).

2.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia e a nanociência vêm dando um impulso extraordinário à evolução do conhecimento, marcando presença em quase todas as revistas científicas da atualidade.

Essa mudança que tem sido crescente desde as últimas décadas. Já está sendo assimilada pela cultura científica universal, permeando as áreas da física, biologia e materiais através da abordagem dos novos sistemas e propriedades na escala nanométrica, e principalmente, molecular (TOMA, 2005).

Nanocarreadores estão sendo extensivamente estudados para a liberação de fármacos no campo da tecnologia farmacêutica, bem como, mais recentemente, nas diferentes áreas de nanociências. Diferentes sistemas têm sido propostos e compreendem nanodispositivos orgânicos e inorgânicos. Em geral, alguns nanocarreadores promissores são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micelas e nanopartículas poliméricas (JÄGER et al, 2007).

2.4.1 Nanopartículas poliméricas

Nos últimos anos, um grande número de nanopartículas poliméricas têm sido estudadas e sintetizadas como promissores sistemas de liberação de fármacos, permitindo uma liberação eficiente e reduzindo efeitos colaterais. Esses sistemas nanoestruturados são rapidamente reconhecidos pelo sistema imune e o fármaco é liberado no sítio de ação com alta eficiência quando comparado com sistemas microparticulados (BHATTARAI et al, 2006).

Reduzir o tamanho de partículas de materiais é uma eficiente ferramenta para a melhoria da sua biodisponibilidade. De fato, sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial, desta forma, são considerados vetores para administração de substâncias, possibilitando uma liberação homogênea e controlada, aumentando a resposta terapêutica no sítio de ação por um período de tempo mais prolongado, além de possibilitar a vetorização de substâncias em órgãos, tecidos, células específicas, diminuindo desta forma, os efeitos adversos sistêmicos destes fármacos (GUTERRES et al, 2007; KIM et al, 2007).

As suspensões de nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 2), as quais diferem entre si segundo a composição da formulação e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica. O fármaco pode ficar adsorvido em sua superfície ou disperso dentro da partícula. Nanocápsulas constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, onde é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. Por sua vez, nanoemulsão corresponde a um sistema micelar, constituído pela dispersão de

tensoativos e óleo em água (SCHAFFAZICK et al, 2003; RAFFIN et al, 2003; REIS et al, 2006).

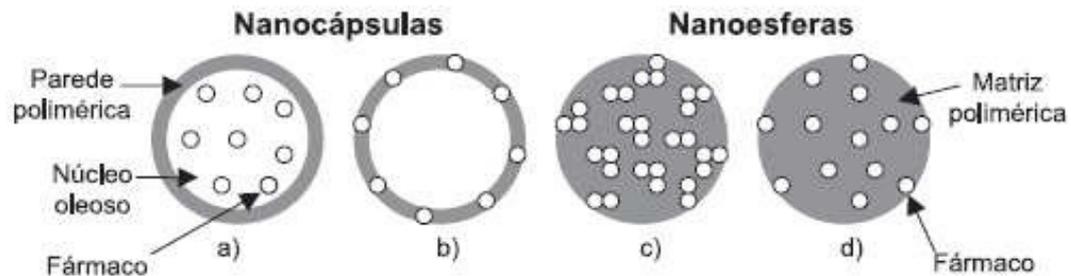


FIGURA 2 – Representação gráfica de nanocapsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; b) fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; c) fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica da nanoesfera (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímero pré-formado, tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Em 1988, Fessi e colaboradores propuseram o método baseado na deposição do polímero pré-formado biodegradável. Este método não apresenta os inconvenientes da presença de monômeros e oligômeros residuais, consequência da polimerização “*in situ*” e a possibilidade de reação cruzada entre o monômero acrílico e o fármaco (AMMOURY et al, 1993; GUTERRES et al, 1995). O método de nanoprecipitação consiste de uma reformulação do processo de emulsificação espontânea para a obtenção de nanoesferas. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo, o tensoativo lipofílico e o fármaco a encapsular. A fase oleosa é vertida, sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensoativo hidrofílico. Esta mistura origina, espontaneamente, as nanocápsulas, com diâmetro médio entre 200 a 500 nm. As nanocápsulas obtidas por esta metodologia são estáveis e, além disso, fornecem elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos (FESSI et al, 1988).

O componente oleoso é de extrema importância já que é nele que ocorrerá a solubilização da substância que se pretende encapsular, sendo a lipossolubilidade da substância ativa neste meio é um fator importante para a encapsulação. Os óleos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos saturados, misturas de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia longa e Miglyol 810[®] e 812[®] (FESSI et al, 1989).

Os derivados de óleo de coco, como o cocoato de butilenoglicol e cocoato sacarose, têm sido amplamente utilizados como excipientes farmacêuticos em produtos cosméticos e farmacológicos. O óleo de coco contém cadeias de ácidos graxos com diferentes comprimentos. As cadeias de ácidos graxos são geralmente não ramificadas e contém de 10 a 20 pares de átomos de carbono, com a maioria constituída, principalmente, por 12 carbonos. As propriedades emoliente, emulsificante, solubilizante e lubrificante fazem destes candidatos atrativos para o uso em formulações de uso tópico (AHSAN et al, 2002).

Tavano e colaboradores (2010) desenvolveram, caracterizaram e avaliaram o perfil de permeação de niossomas com a mistura de cocoato sacarose e colesterol com sulfadiazina e diclofenaco como modelos de fármacos. O estudo mostrou que o cocoato sacarose foi capaz de formar vesículas na presença ou não do colesterol.

A utilização de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou ativos cosméticos é uma alternativa interessante para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas e facilitar sua absorção ou penetração cutânea. Dentre os polímeros utilizados a poli(ϵ -caprolactona) destaca-se devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, pois é um polímero semi-cristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos (GUTERRES et al, 2007).

As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores e emulsões, pois podem conferir proteção da substância ativa nela incorporada frente à degradação química. Uma vez que a substância ativa fica retida no interior de uma matriz sólida ou de um invólucro polimérico, que também tem a função de controlar a liberação da substância ativa ao meio de dispersão, evita o contato do fármaco com os tecidos, reduzindo a irritação do mesmo sobre o local de administração (DINGLER et al, 1999; COUVREUR et al, 2002; HANS; LOWMAN, 2002).

2. 4. 2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Após a preparação, as nanocápsulas podem ser caracterizadas mediante a combinação de diversas técnicas, sendo estas, principalmente: a análise morfológica, distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta e do pH e a determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas (COUVREUR et al, 2002; SCHAFFAZICH et al, 2003).

A determinação da distribuição do tamanho de partícula é uma das avaliações mais importantes das suspensões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação durante armazenagem pode ser monitorada por este parâmetro. Além disso, valores reduzidos de diâmetro de partícula são fundamentais para a absorção e distribuição *in vivo* das suspensões coloidais (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

O diâmetro de partículas fornece informações importantes a respeito da influência dos componentes da formulação sobre as características físico-químicas da suspensão coloidal obtida. Santos-Magalhães e colaboradores (2000), observaram que parâmetros como a velocidade de agitação utilizada no momento de preparação das nanopartículas e fatores de formulação (quantidades de polímero e tensoativos e volume de solvente orgânico) são capazes de influenciar no tamanho das nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991; MOSQUEIRA et al, 2000).

Os fosfolípidos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al, 2003).

A determinação do potencial zeta também pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas (ALONSO et al, 1991). Alonso e colaboradores

(1991) observaram que o potencial zeta de nanoesferas de poli (cianoacrilato de butila) foi determinado para inferir no mecanismo pelo qual o fármaco, sulfato de amicacina, e este polímero interagem. Desta forma, foi verificado que, quando o fármaco foi adicionado às nanopartículas em quantidades crescentes, a redução, em módulo, do potencial zeta foi concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco. Os autores sugeriram que ocorre uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero.

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero ou outros componentes da formulação (SCHAFFAZICK et al, 2003; GUTERRES et al, 1995).

A diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto a hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentam redução dos valores de pH num período de 3 a 5 meses. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas (SCHAFFAZICK et al, 2002).

A avaliação da quantidade de substância ativa presente nas nanopartículas é fundamental, porém complicada, devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. As técnicas de separação mais comumente utilizadas são a ultracentrifugação ou ultrafiltração-centrifugação. A substância ativa livre é determinada no sobrenadante enquanto a substância ativa total é medida após completa dissolução das nanocápsulas em um solvente apropriado (MAGENHEM; BENITA, 1991). O conteúdo de substância ativa no interior das nanocápsulas é determinado em função da diferença entre o total de substância ativa contida na suspensão e a quantidade de fármaco livre na suspensão, a qual é determinada após a separação das fases por ultrafiltração-centrifugação (SCHAFFAZICK et al, 2003).

2.4.3 Antimicrobianos e sistemas coloidais

Um uso evidente das nanopartículas seria melhorar o desempenho de drogas bacterianas que apresentam pouca solubilidade ou instabilidade, proteger o fármaco frente a degradação, aumentar a especificidade de ação e, por conseqüência, aumentar a atividade

terapêutica, resultando assim, em doses terapêuticas menores, com redução dos efeitos tóxicos (LEGRAND et al, 1999; GREENHALGH; TUROS, 2008).

Em estudos anteriores, Dalencon e colaboradores (1997) formularam suspensões coloidais com nanocápsulas de PLA contendo rifabutina e atovaquona para aumentar suas biodisponibilidades. A suspensão com nanocápsulas contendo atovaquona foi mais estável que a suspensão contendo rifabutina, quando injetada via gástrica em ratos infectados com *Toxoplasma gondii*.

Lopes e colaboradores (2000) relataram a nanoencapsulação da etionamida, uma segunda linha de droga contra a tuberculose. Al-Adham e colaboradores (2000) avaliaram a estabilidade de várias formulações de microemulsões sob o ponto de vista microbiológico, através da cinética de morte e microscopia eletrônica de transmissão das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Comprovaram que o rompimento das membranas foi a principal causa da morte que ocorreu de forma rápida, ou seja, em 45 segundos após o contato com as substâncias.

Lboutounne e colaboradores (2002) avaliaram a atividade bactericida, *in vitro*, da clorexidina encapsulada em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), os resultados demonstraram que a encapsulação da clorexidina manteve a atividade antimicrobiana contra várias bactérias.

A atividade antimicrobiana de várias formulações de microemulsões, também foi avaliada por Fu e colaboradores (2006), os quais verificaram que houve melhor estabilidade dos produtos quando a taxa de surfactante:cosurfactante foi na proporção de 3:2 apresentando, portanto, melhor ação antimicrobiana.

Shahverdi e colaboradores (2007) demonstraram a eficiência de antibióticos com nanopartículas de prata no controle de microrganismos. A atividade antibacteriana da penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina foram aumentadas na presença de nanopartículas de prata contra as cepas testes.

Turos e colaboradores (2007) desenvolveram análogos de penicilina que foram incorporados em sistemas de nanopartículas com poliacrilato, o qual demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias produtoras de β -lactamases e ausência de efeitos citotóxicos em culturas de células humanas saudáveis.

Oliveira e colaboradores (2007) comprovaram o aumento das propriedades antimicrobianas de sistemas nanoestruturados frente a microrganismos como *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, levedura de *Candida albicans* e o bolor *Aspergillus niger*.

O grande interesse que os sistemas nanoestruturados têm despertado na área farmacêutica e cosmética como veículo de preparações farmacêuticas se deve à capacidade de carrear substâncias com diferentes características, possibilitando a modificação da biodisponibilidade e a diminuição da toxicidade de vários fármacos.

Nestas preparações, não são empregados conservantes microbiológicos, pois apresentam grandes quantidades de tensoativos, o que dificulta o desenvolvimento de microrganismos. Outra hipótese para a ação antimicrobiana seria o fato de afetarem a estrutura e função da membrana citoplasmática microbiana (OLIVEIRA et al, 2007).

2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

O procedimento de validação de técnicas analíticas de controle de qualidade de insumos e produtos farmacêuticos acabados é preconizado em compêndios oficiais (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002; BRITISH PHARMACOPEIA, 2008; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007) e constitui-se em uma exigência das agências regulatórias sanitárias de vários países. Da mesma forma, as diretrizes estabelecidas pelo *ICH – Harmonized Tripartite Guideline* (2005) para validação de métodos analíticos são de reconhecimento e aceitação internacional nesta área.

Nas determinações quantitativas de fármacos é essencial empregar métodos analíticos bem caracterizados e completamente validados para gerar resultados confiáveis e que possam ser satisfatoriamente interpretados (SHAH et al, 2000).

A legislação nacional define que, no caso de metodologias analíticas descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, o método será considerado validado. Porém, no caso de não estarem descritas nestes compêndios oficiais, a metodologia somente será considerada validada se forem avaliados os parâmetros de especificidade e seletividade; linearidade; intervalo; precisão; limite de detecção (sensibilidade); limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

O ICH (2005) e a ANVISA (BRASIL, 2003) definem a especificidade e seletividade como sendo a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em

presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A linearidade é definida como sendo a capacidade da metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Já o intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, sendo que, para a determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas a faixa compreendida fica entre 80% a 120% da concentração teórica do teste. Normalmente, o intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.

A precisão da metodologia é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-dia): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Podendo ser verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- Precisão intermediária (precisão inter-dias): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes;

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O limite de detecção é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Por outro lado, o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 2005).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro e a robustez de um método analítico é a

medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas, solventes e outros materiais

- Acetato de Etila – Nuclear
- Acetona P.A – Nuclear
- Acetonitrila – Merck
- Ácido Fosfórico – Nuclear
- Água de MilliQ[®]
- Coccoato de Butilenoglicol (Coccoato Bg[®]) – Via Farma
- Coluna cromatográfica - Lichrospher[®] – 100 RP18 (250 mm, 4,0 mm, 5 µm) – Merck
- Cloreto de sódio – Nuclear
- Clorofórmio – Nuclear
- Diclorometano – Nuclear
- Dimetilsulfóxido – Vetec
- Etanol – Álcool Etílico – Nuclear
- Hidróxido de amônio – Nuclear
- Meio de cultura Agar MacConkey – Merck
- Meio de cultura Agar Mueller Hinton – Acumedia
- Membrana 0,22 µm – Millipore[®]
- Metanol grau CLAE – J.T. Baker
- Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico – Via Farma
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich
- Placas de petri
- Poli(ε-caprolactona) $\square_w = 65000$ – Sigma Aldrich
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Sigma Aldrich
- Sulfadiazina de prata – Delaware
- Tampão pH 4,0
- Tampão pH 7,0

3.1.2 Equipamentos

- Autoclave – Phoenix
- Balança analítica AX200 – Shimadzu
- Capela de fluxo laminar – Pachane
- Centrifuga TDL80-2B – Centribio
- Cilindro de aço inox de tamanho uniforme (8 x 6 x 10 mm)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE – Cromatógrafo líquido Young Lin Instrument modelo YL9100 CLAE System, equipamento com bomba modelo YL 9110, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo YL 9160
- Estufa bacteriológica – Nova Técnica
- Evaporador Rotatório - Fisatom
- Paquímetro Mitutoyo – Sul Americana Ltda
- Potenciômetro – Digimed
- Zetasizer[®] - Nano – ZS – Malvern

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 TESTE DE INCHAMENTO DO POLÍMERO

Filmes de poli(ϵ -caprolactona) foram obtidos através da dissolução completa do polímero em clorofórmio e subsequente evaporação total do solvente orgânico em temperatura ambiente. Filmes com cerca de 250 mg foram imersos no cocoato de butilenoglicol e armazenados. Os filmes foram afastados do contato com o óleo, secos suavemente com papel absorvente e pesados em balança analítica nos tempos 0, 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. O teste foi realizado em triplicata.

3.2.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO SDA_g

As suspensões coloidais de nanocápsulas (NC) contendo sulfadiazina de prata foram obtidas pela utilização do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado,

proposto por Fessi e colaboradores (1989), utilizando os componentes e as concentrações descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Componentes utilizados na preparação das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata.

Constituintes* (%)	NCMY	NCCO	NCMYBr	NCCOBr
<u>Fase Orgânica</u>				
Sulfadiazina de prata	0,015	0,015	-	-
Poli-ε-caprolactona (PCL)	0,5	0,5	0,5	0,5
Cocoato de butilenoglicol	-	1,5	-	1,5
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico	1,5	-	1,5	-
Acetona	135	135	135	135
Monoestearato de Sorbitano	0,383	0,383	0,383	0,383
<u>Fase Aquosa</u>				
Polissorbato 80	0,383	0,383	0,383	0,383
Água	265	265	265	265

* Volume final de 50 mL; NC MY: Nanocápsula contendo 0,3 mg/mL de sulfadiazina de prata contendo Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico como componente oleoso; NC CO: Nanocápsula contendo 0,3 mg/mL de sulfadiazina de prata contendo cocoato de butilenoglicol como componente oleoso e NC Br: Nanocápsula Branca.

A fase orgânica, contendo o polímero, o tensoativo, solvente, óleo e o fármaco, foi mantida a 40⁰ C até dissolução dos componentes. Após, a fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa, sob agitação moderada e a mistura permaneceu sob agitação durante 10 minutos. As suspensões foram concentradas, a um volume final de aproximadamente 50 mL, utilizado um evaporador rotatório, para a eliminação do solvente orgânico e excesso de água. Posteriormente a suspensão foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL para o ajuste do volume e da concentração final do fármaco.

As nanocápsulas foram preparadas na concentração de 0,3 mg/mL e também com o uso de dois diferentes núcleos oleosos, o cocoato de butilenoglicol e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico. Além dessas, foram preparadas nanocápsulas brancas, sem a sulfadiazina de prata. As formulações foram preparadas em triplicatas.

3.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas com sulfadiazina de prata

A caracterização foi realizada com o objetivo de comparar as suspensões de nanocápsulas contendo SDAg com os diferentes núcleos oleosos, cocoato de butilenoglicol e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.

A avaliação das suspensões foi realizada após 2 dias da preparação. Cada determinação foi realizada em triplicada.

3.2.3.1 Determinação do pH

As determinações do pH foram determinadas por potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e as medidas foram realizadas diretamente nas suspensões. Os resultados foram expressos pela média das três determinações.

3.2.3.2 Distribuição do tamanho de partícula e índice de polidispersão

As determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanocápsulas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. As suspensões foram diluídas 500 vezes (v/v) em água ultrapura (MilliQ[®]), para análise no equipamento, Zetasizer[®], Nano-ZS (Malvern). Os resultados foram determinados através da média de três repetições.

3.2.3.3 Potencial zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese. Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (v/v) das suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10 mM. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

3.2.3.4 Testes de extração do fármaco

Para a liberação e dissolução do ativo do interior das nanocápsulas, as suspensões com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e as suspensões com cocoato de butilenoglicol

foram submetidas a processos de extração com diferentes diluentes. As amostras foram avaliadas de acordo com a sua turbidez e suas concentrações obtidas após a análise da amostra por CLAE.

Todas as amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 5 minutos e sonicação por 20 minutos.

Na Tabela 2, encontram-se os diluentes usados na extração da SDAg para o doseamento da suspensão de nanocápsula contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e da suspensão de nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol.

TABELA 2 – Diluentes usados na extração da SDAg nas suspensões contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

Testes	NC	ACN	HA	DMSO	FM	Etanol	Metanol	DCM	Acetona	Acetato Etila
1	0,5	4	-	-	6	-	-	-	-	-
2	0,5	4	2	-	-	-	-	-	-	-
3	0,5	4	6	-	-	-	-	-	-	-
4	0,5	-	8	2	-	-	-	-	-	-
5	0,5	7,5	-	2	-	-	-	-	-	-
6	0,5	9	-	0,5	-	-	-	-	-	-
7	0,5	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-
8	2	2	-	-	6	-	-	-	-	-
9	0,5	5	5	-	-	-	-	-	-	-
10	0,1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
12	0,1	-	1	-	-	-	1	-	-	-
13	0,1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
14	0,1	-	-	-	1	1	-	-	-	-
15	0,1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
16	0,1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
17	0,1	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	-
18	0,1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
19	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

NC: Suspensões de nanocápsulas com SDAg contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato de butilenoglicol; ACN: Acetonitrila; HA: Hidróxido de amônio; DMSO: Dimetilsulfóxido; FM: Fase móvel (água, acetonitrila e ácido fosfórico); DCM: Diclorometano.

O mesmo método de preparação da amostra foi utilizado tanto para o doseamento, como para a validação dos parâmetros de repetibilidade e determinação da precisão intermediária das amostras em estudo.

3.2.3.5 Doseamento da SDAg nas suspensões coloidais

O doseamento da sulfadiazina de prata foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como base a metodologia descrita por Foroutan e colaboradores (2002).

As análises foram realizadas em cromatógrafo YL9100 HPLC, utilizando-se detector ultravioleta 254 nm, coluna C₁₈ (Lichrospher[®] 100 RP 18,250 mm x 40 cm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de água, acetonitrila e ácido fosfórico em uma proporção 900: 99: 1 (v/v), com fluxo de 2,0 mL por minuto.

3.2.3.6 Determinação da taxa de associação

A concentração de substância ativa associada às nanocápsulas foi determinada por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total de SDAg na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão. A concentração total foi determinada segundo o item (3.2.3.5). A determinação do fármaco livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação das suspensões com utilização de membranas Microcon[®], MC Millipore 10.000 Da, durante 5 minutos a 5000 rpm repetitivamente, até obter-se 40 µL de ultrafiltrado, no qual a SDAg não associada (livre) foi quantificada por CLAE.

3.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DA SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES COM NANOCÁPSULAS

Os parâmetros de validação da metodologia, para doseamento da SDAg, utilizados foram baseados na Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2003). A metodologia foi validada pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação, seguindo, também, as orientações das diretrizes do ICH (Harmonised Tripartite Guideline, 2005) e da Farmacopéia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

A metodologia foi validada para as formulações de suspensão de nanocápsulas contendo SDAg com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso e

suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

3.3.1 Linearidade (Curva de Calibração)

Para a construção da curva analítica, foi pesado o equivalente a 250 mg de SDAg em um tubo de centrifuga de 50 mL, adicionou-se 35 mL de metanol, e foi submetida a agitação em vórtex por 15 segundos. Centrifugou-se por 15 minutos para separar as fases e o metanol foi desprezado. Adicionou-se 30 mL de hidróxido de amônia (9:1) no tubo de centrifuga, colocou-se no vórtex por 15 segundos. Transferiu-se quantitativamente todo o conteúdo do tubo para um balão volumétrico de 200 mL, lavando-o com 30 mL de hidróxido de amônio (9:1) por 3 vezes. Completou-se com hidróxido de amônio. Transferiu-se 2,0 mL dessa solução para um balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se com a fase móvel (água, acetonitrila e ácido fosfórico, 900:99:1). A partir desta solução (50 µg/mL), a curva analítica foi construída nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, utilizando-se a fase móvel como solvente. O procedimento foi realizado em triplicata.

TABELA 3 – Curva analítica usada para determinação da SDAg.

Balão	Solução padrão (mL)	Concentração (µg/mL)
1	1	5
2	2	10
3	3	15
4	4	20
5	5	25

As áreas médias, correspondentes a três determinações para cada diluição de SDAg, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL), no eixo das abscissas.

A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Os valores experimentais foram tratados estatisticamente, através da análise de variância – ANOVA.

3.3.2 Repetibilidade e precisão

A repetibilidade do método foi realizada através da determinação de 6 repetições, nas concentrações de trabalho de 15 µg/mL, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais.

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido pela determinação da SDAg nas suspensões de nanocápsulas, avaliando-se a repetibilidade e a precisão intermediária do método.

A precisão intermediária foi obtida através da determinação da SDAg nas formulações, em três dias e por dois analistas diferentes.

3.3.3 Exatidão

A exatidão foi determinada adicionando-se quantidade conhecida de solução padrão de SDAg na solução amostra. A solução padrão de SDAg, foi preparada em uma concentração de 100 µg/mL, utilizando-se fase móvel (água, acetonitrila e ácido fosfórico) como solvente. As concentrações teóricas finais obtidas encontram-se descritas na Tabela 4.

TABELA 4 – Teste de recuperação da SDAg e suas concentrações teóricas finais.

Balões	Solução amostra (mL)	Solução padrão (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
A*	1,0	-	7,5
R1*	1,0	4,5	12
R2*	1,0	7,5	15
R3*	1,0	10,5	18

* A (Solução amostra sem adição de padrão), R1; R2 e R3 (Solução amostra com adição de diferentes concentrações da solução padrão)

As porcentagens de recuperação R(%) da SDAg nas amostras foram calculadas através da seguinte equação:

$$R\% = [(C_a - C_{na}) / C_p]$$

Onde:

R% = porcentagem de recuperação;

C_a = concentração de SDAg encontrada na amostra adicionada de padrão (R1, R2 e R3);

C_{na} = concentração de SDAg encontrada na amostra sem adição de padrão;

C_p = concentração de SDAg ($\mu\text{g/mL}$) na solução padrão.

3.3.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada utilizando-se as suspensões de nanocápsulas sem a presença de SDAg (formulação branca), estas formulações foram comparadas com as amostras contendo nanocápsulas de SDAg.

As amostras foram preparadas de acordo com o item 3.3.2 Para verificação de possíveis interferências dos excipientes na determinação do teor de SDAg nas suspensões, foram traçados espectros de absorção na faixa de 200 nm a 400 nm.

3.3.5 Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção (LD) foi calculada pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas analíticas dos ensaios de linearidade, pelas médias dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicando por 3, de acordo com a equação:

$$LD = [DPa \times 3] / IC$$

Onde:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas padrão;

IC = inclinação média das curvas padrão.

3.3.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi calculado pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade, pelas médias dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicado por 10 de acordo com a equação:

$$LQ = [DPa \times 10] / IC$$

Onde:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, 3 curvas padrão;

IC = inclinação média das curvas padrão.

3.4 MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR

A técnica quantitativa padrão para medir a susceptibilidade, *in vitro*, aos antimicrobianos é a concentração inibitória mínima (CIM) do ensaio. Uma série de protocolos aprovados foram descritos pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), anteriormente conhecido como o National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS). No entanto, tanto o método de difusão em ágar como os métodos de micro-diluição requerem o cumprimento estrito de protocolos para assegurar resultados válidos (TROTT et al, 2007).

Para o ensaio microbiológico por difusão em ágar toda vidraria e soluções utilizadas nos ensaios foram previamente esterilizadas a 121 °C durante 15 minutos.

3.4.1 Meio de cultura Ágar MacConkey

Pesou-se 50,0 g de meio de cultura. Transferiu-se para um erlenmeyer de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada. Ferveu-se até completa solubilização e esterilizou-se a solução durante 15 minutos a 121 °C. Resfriou-se o meio de cultura à temperatura de 48 °C previamente à sua utilização no ensaio.

3.4.2 Meio de cultura Ágar Müller-Hinton

Pesou-se 38,0 g de meio de cultura. Transferiu-se para um erlenmeyer de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada. Após completa solubilização esterilizou-se a solução durante 15 minutos a 121 °C. Resfriou-se o meio de cultura à temperatura de 48 °C previamente à sua utilização no ensaio.

3.4.3 Solução padrão de sulfadiazina de prata

Pesou-se uma quantidade exata de pó equivalente a 150 mg de SDAg e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a concentração final de 1500 µg/mL. Alíquotas desta solução foram diluídas em DMSO e água (1: 1) para obter as soluções trabalho nas concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL (P1, P2 e P3), as quais foram utilizadas no ensaio, segundo as recomendações da Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002.

3.4.4 Solução amostra de nanocápsulas de sulfadiazina de prata

Das suspensões de nanocápsulas contendo SDAg com uma concentração de 300 µg/mL, foram diluídas, em DMSO e água (1: 1) alíquotas para as soluções trabalho com concentrações teóricas de 100; 200 e 300 µg/mL, denominadas de A1, A2 e A3, respectivamente.

3.4.5 Microrganismo e padronização do inóculo

A cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi selecionada para o ensaio. Colônias foram transferidas assepticamente para o meio de cultura ágar McConkey e incubadas por 48 horas a 37°C. Repiques da cultura inicial foram realizados em tubos contendo 10 mL do meio de cultura ágar Müller-Hinton inclinado e incubados a 37 °C durante 24 horas antes do ensaio. Conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (1988), preparou-se uma suspensão de inóculo a 25 ± 2 % de transmitância em fotocolorímetro ajustado a 580 nm, empregou-se solução fisiológica estéril (0,9 %) para ajuste do branco. Alíquotas de 0,1 mL da solução salina inoculada e padronizada foram adicionados a 100 mL do meio ágar Müller-Hinton a 48 °C para preparar a camada base (inoculada) das placas de Petri.

3.4.6 Procedimento do ensaio microbiológico

A camada base de ágar foi composta pelo meio Müller-Hinton (21 mL), adicionada em placa de Petri (100 x 20 mm), previamente inoculada. Seis cilindros de aço inóx estéreis de tamanho uniforme (8 x 6 x 10 mm) foram distribuídos sobre a superfície de ágar inoculado em cada placa. Alternadamente, três cilindros foram preenchidos com 150 µL de cada dose

das soluções de referência e amostra. Três placas foram utilizadas em cada ensaio. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora para pré-difusão, e após incubadas a 37 °C durante 24 horas. O diâmetro dos halos de inibição de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* observados no ágar foi determinado visualmente empregando-se paquímetro digital. Todas as placas foram avaliadas pelo mesmo operador.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada pela análise descritiva de variáveis como a média, desvio padrão, coeficiente de variação, estudos de correlação, regressão linear simples e análise de variância (ANOVA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DO INCHAMENTO DO POLÍMERO

Com o objetivo de verificar se o polímero selecionado para a formulação das nanocápsulas, a poli(ϵ -caprolactona), seria afetado pelo cocoato de butilenoglicol, constituinte do núcleo das vesículas, foi conduzido o teste de inchamento do polímero no sentido de verificar se poderia haver seu inchamento ou dissolução pelo componente do núcleo oleoso. A Figura 3 mostra as variações de massa do polímero após diferentes tempos de contato com o cocoato de butilenoglicol.

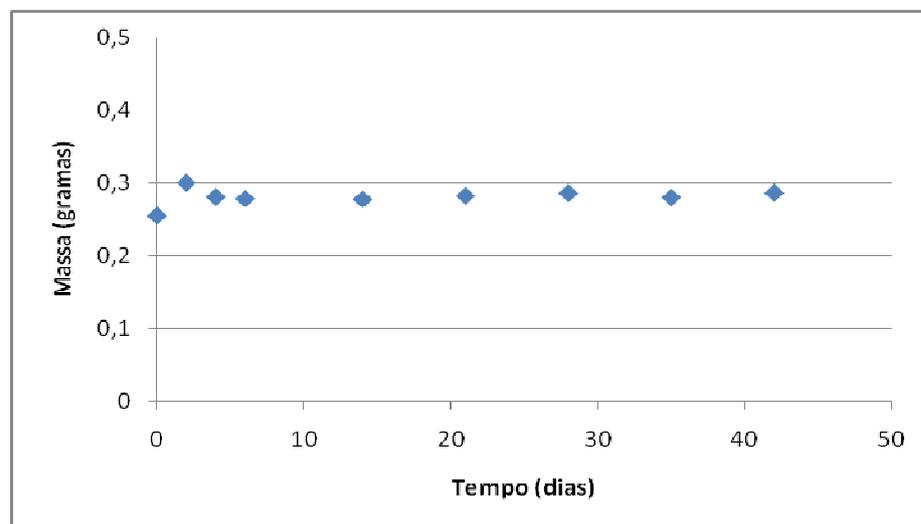


FIGURA 3 – Massa de poli(ϵ -caprolactona) após imersão no óleo cocoato de butilenoglicol por 45 dias (n = 3).

Como metodologia da adequabilidade das matérias-primas (polímeros e óleos) para a formulação de nanocápsulas, Guterres e colaboradores (2000) desenvolveram um método de determinação do inchamento do polímero pelos componentes do núcleo oleoso. Neste estudo foi avaliado o inchamento de filmes de poli(ϵ -caprolactona) frente à triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, constituinte do núcleo de nanocápsulas. Como resultado observou-se que as massas dos polímeros permaneceram constantes por 13 dias indicando a não dissolução dos polímeros em triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico. No presente estudo, empregando-se a mesma metodologia deste estudo (GUTERRES et al, 2000), foi verificado que a massa de filmes de poli(ϵ -caprolactona) em cocoato de butilenoglicol não variou. No primeiro dia de estudo as massas dos filmes poliméricos sofreram um incremento discreto (Figura 3), porém não significativo, pois foi devido a quantidade residual de óleo aderido ao filme que não pode

ser completamente retirado com papel absorvente. A partir da segunda pesagem as massas dos filmes de polímero permaneceram constantes, indicando que o núcleo oleoso utilizado nas nanocápsulas em estudo não dissolve o polímero, o que possibilita a formação de uma parede polimérica em torno do núcleo oleoso das nanocápsulas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES

As suspensões de nanocápsulas contendo SDAg foram preparadas com sucesso seguindo a metodologia descrita no item 3.2.2. Todas as formulações obtidas apresentaram aspecto homogêneo, com coloração leitosa branca.

As características físico-químicas das suspensões foram avaliadas através da determinação do pH, da distribuição do diâmetro das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, teor e taxa de associação.

4.2.1 Determinação do pH

A medida do pH é importante na avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, pois alterações deste parâmetro podem estar relacionadas com a degradação do polímero, de algum outro componente da formulação ou até mesmo difusão da substância ativa da partícula para o meio aquoso (GUTERRES et al, 1995).

A Tabela 5 apresenta os resultados de pH referente as suspensões de nanocápsulas contendo SDAg, nos dias 1, 30, 45 e 60 dias de análise.

TABELA 5 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata durante 60 dias de análises (n = 3).

Tempo	NC CO	NC CO BR	NC MY	NC MY Br
Dias	pH ± DP	pH	pH ± DP	pH
1	5,6 ± 0,77	6,05	5,5 ± 0,53	4,85
30	5,7 ± 0,66	6,25	5,8 ± 0,63	4,92
45	5,6 ± 0,67	5,44	5,4 ± 0,51	4,78
60	5,7 ± 0,46	6,28	5,7 ± 0,59	5,11

Através da Tabela 5, pode-se observar, pelos valores apresentados, para ambas as formulações (NC CO e NC MY), que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados, quando comparadas aos valores no período inicial e final do experimento. Estes valores de pH levemente ácidos, estão de acordo com os resultados descritos na literatura para estes tipos de sistemas (ALVES et al, 2007).

4.2.2 Diâmetro das partículas e Índice de polidispersão

As suspensões contendo SDAg e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico apresentaram diâmetro médio de 225 nm ($\pm 1,71$) e índice de polidispersão inferior a 0,195 ($\pm 0,02$) (Figura 4)

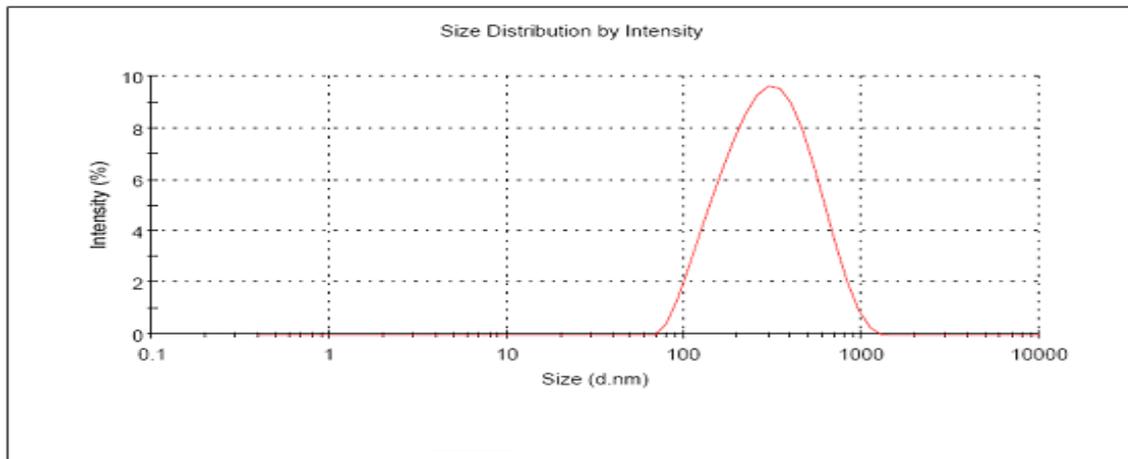


FIGURA 4. Distribuição do tamanho de partícula obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

As suspensões contendo SDAg e cocoato de butilenoglicol apresentaram diâmetro médio em torno de 221,4 nm ($\pm 2,3$) e índice de polidispersão inferior a 0,152 ($\pm 0,019$) (Figura 5).

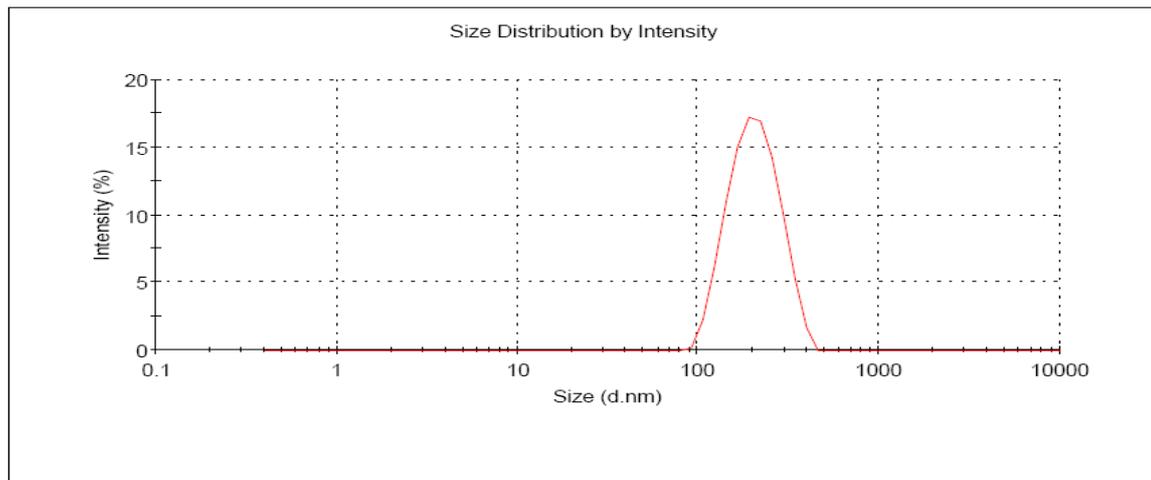


FIGURA 5. Distribuição do tamanho de partículas obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

Fatores como o tipo e a concentração do polímero na fase orgânica, a polaridade do solvente, a natureza e a proporção das fases interna/externa e a natureza e concentração do surfactante são fatores essenciais para a determinação do tamanho das nanocápsulas (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000; ZILI et al, 2005).

Alonso e colaboradores (2002) mostraram que o aumento da concentração do fármaco sulfato de amicacina ocasionou o aumento do diâmetro das nanocápsulas. Já, Losa e colaboradores (1992) constataram que o diâmetro de nanocápsulas contendo metipranolol preparadas com o óleo Labrafil[®] apresentaram diâmetro menor que as preparadas com o óleo Miglyol 840[®], e a concentração de óleo não influenciou o diâmetro das partículas. A influência do tipo e da massa molar do polímero sobre o tamanho de partícula foi observada por Marchais e colaboradores (1998) a partir de nanocápsulas de PCL, PLA e PLGA contendo fenilbutazona. Nanocápsulas preparadas com PLA e com PLGA demonstraram menores tamanhos de partículas em relação a nanocápsulas preparadas com PCL.

O tamanho de partícula é um importante parâmetro a ser avaliado para controlar o processo de obtenção e, particularmente, assegurar a qualidade da formulação, porque a estabilidade física de dispersões vesiculares depende do tamanho de partícula e da distribuição do tamanho (MULLER-GOYMANN, 2004).

Diâmetros entre 100 e 500 nm e população monodispersa são características dos colóides obtidos pelo método de nanoprecipitação (FESSI et al, 1989; COUVREUR et al, 2002).

Assim como pode ser observado, nas Figura 4 e Figura 5, os valores dos diâmetros de partículas de ambas as suspensões, com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato

de butilenoglicol, podem ser considerados de acordo com o recomendado para o uso em formulações farmacêuticas e cosméticas destinadas a aplicação tópica.

O diâmetro médio das nanocápsulas, em ambas as suspensões, não sofreu alteração significativa após 30 dias.

4.2.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi de aproximadamente -26 mV ($\pm 1,09$) para NC MY (Figura 6)

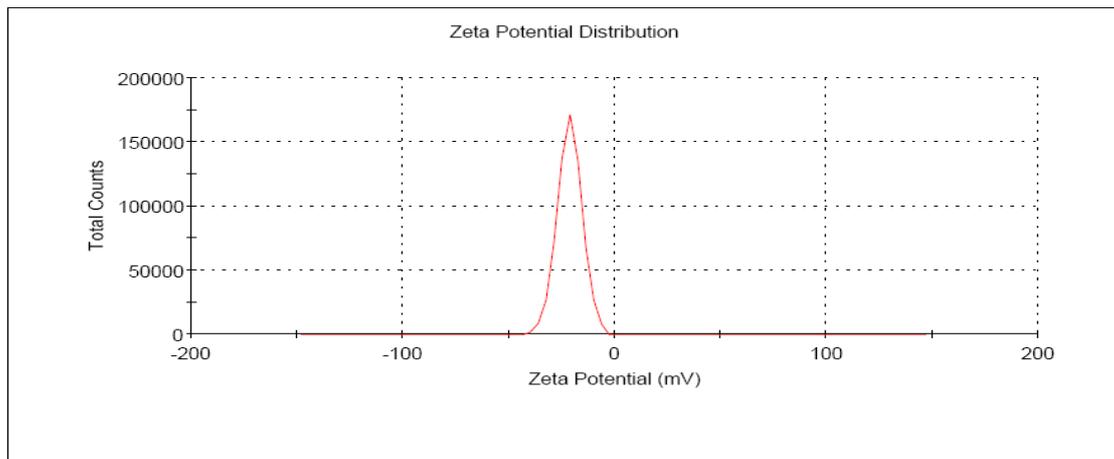


FIGURA 6. Potencial zeta apresentado pelas suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

Para as NC CO os valores foram de aproximadamente $-27,9 \text{ mV}$ ($\pm 1,7$) (Figura 7)

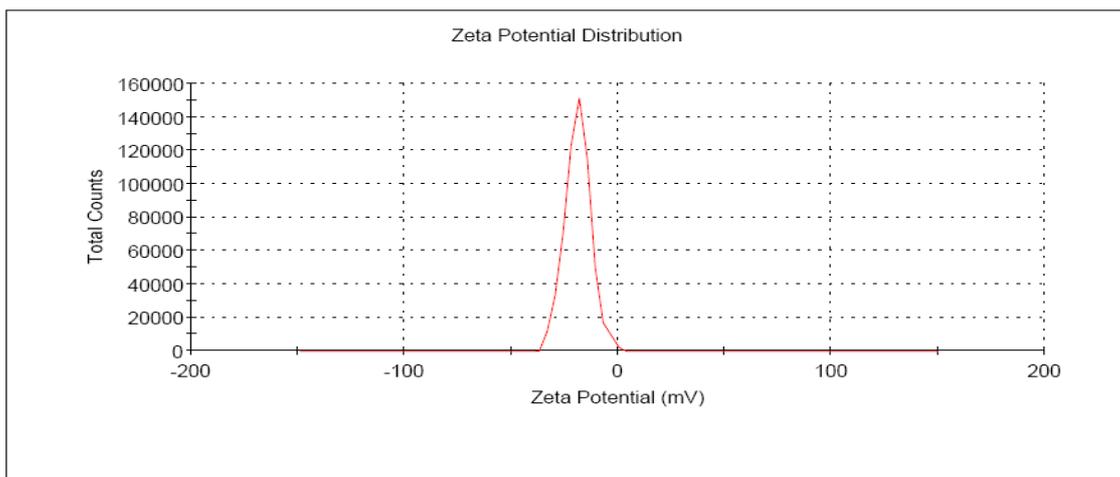


FIGURA 7. Potencial zeta apresentado pelas suspensões de nanocápsulas contendo sulfadiazina de prata e coato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

O potencial zeta depende, principalmente, da natureza química do polímero, da natureza química do tensoativo e do pH do meio. Portanto, quando nanocápsulas são

preparadas a partir de polímeros de poliéster ou metacrilato, usando tensoativos não iônicos, valores de potencial zeta negativos são encontrados devido a presença de grupos carboxílicos terminais do polímero. Da mesma forma, valores positivos de potencial zeta são obtidos quando polímeros catiônicos são usados com tensoativos não iônicos.

Por outro lado, quando nanocápsulas são preparadas com polímeros carregados negativamente e tensoativos carregados negativamente, valores negativos de potencial zeta são obtidos com valores absolutos superiores quando os tensoativos sem carga são utilizados. Da mesma forma o potencial zeta é positivo quando agentes tensoativos com cargas positivas são escolhidos.

Esse comportamento é devido a adsorção do tensoativo sobre a superfície das nanocápsulas, que no caso do PCL, pode ser explicada pela sua natureza hidrofóbica, conseqüentemente as cadeias de hidrocarbonetos do tensoativo interagem com as regiões hidrofóbicas das paredes do PCL, o que induz um potencial zeta positivo ou negativo, dependendo da sua natureza química (JOO et al, 2008).

Os valores de potencial zeta obtidos, tanto para as suspensões contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como as suspensões contendo cocoato de butilenoglicol, são considerados adequados para reduzir a tendência de sistemas em partículas em agregar e precipitar das nanoestruturas, devido à repulsão eletrostática que apresentam, resultante da densidade de carga de superfície.

4.2.4 Preparação das amostras

As suspensões de nanocápsulas contendo SDAg foram submetidas a processos de extração, os quais os diluentes usados estão representados na Tabela 6. As amostras foram avaliadas de acordo com a turbidez e as concentrações obtidas após a análise da amostra por CLAE.

TABELA 6 – Testes de extração da SDAg a partir das suspensões de nanocápsulas.

NC	ACN	HA	DMSO	FM	Etanol	Metanol	DCM	Acetona	Acetato de Etila	Resultado
0,5	4	-	-	6	-	-	-	-	-	Turvou
0,5	4	2	-	-	-	-	-	-	-	Turvou
0,5	4	6	-	-	-	-	-	-	-	Tuvou
0,5	-	8	2	-	-	-	-	-	-	Turvou
0,5	7,5	-	2	-	-	-	-	-	-	s/ pico
0,5	9	-	0,5	-	-	-	-	-	-	s/ pico
0,5	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	31%
2	2	-	-	6	-	-	-	-	-	Turvou
0,5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	Turvou
0,1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	25%
0,1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	Turvou
0,1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	Turvou
0,1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	Turvou
0,1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	70%
0,1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	Turvou
0,1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	46%
0,1	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	-	38%
0,1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	s/ pico
0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	20%

A SDAg é um composto insolúvel e em contato com solventes comuns sofre uma hidrólise, causando a dissociação da molécula em SD^- e Ag^+ , o que leva à formação de complexos de prata (KUNKELY; VOGLER, 2007). Isso explica a turbidez das amostras na maioria dos diluentes utilizados.

Os melhores diluentes para as amostras de suspensões de nanocápsulas contendo SDAg foram o etanol e fase móvel (água, acetonitrila e ácido fosfórico), os quais se mostraram límpidos e extraiu mais fármaco. A SDAg é um sal orgânico ácido fraco, portanto a sua solubilidade aumenta, com o aumento da concentração de íons de hidrogênio, ou seja em pH ácido.

Em outros estudos, Foroutan e colaboradores (2002) utilizaram a metodologia da Pharmacopéia Americana para o doseamento e estabilidade de uma formulação spray com sulfadiazina de prata e utilizaram hidróxido de amônio (25%) e metanol como soluções diluentes. Já Lichtenstein e Margalit acharam que DMSO contendo NH_3 140 mM foram os melhores solventes para a dissolução de lipossomas na determinação da SDAg encapsulada.

Após todo o processo de extração, a suspensão contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico apresentou uma concentração de SDAg acima de 70%, e a suspensão com cocoato de butilenoglicol uma concentração de aproximadamente 50% de SDAg, após a análise por CLAE.

4.2.5 Taxa de associação

As taxas de associação foram superiores a 99% para as suspensões de nanocápsulas contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso e para as nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

Lichtenstein e Margalit (1995) obtiveram lipossomas com SDAg com alta eficiência de encapsulação (> 90%) em diferentes concentrações de lipídeos.

Já para nanocápsulas, Grillo e colaboradores (2009) obtiveram uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 70% em nanocápsulas de PLA contendo benzoacaina.

Existem diferentes fatores que são determinantes para a eficiência de encapsulação de fármacos nas nanocápsulas. Por exemplo, a natureza química ativa do fármaco e sua polaridade, em particular, determinam a eficiência de encapsulação. Nesse sentido, drogas hidrofílicas podem atingir valores máximos de 10% e, em casos de compostos lipofílicos esses valores podem ser superiores a 70% (MA et al, 2001; STELLA et al, 2007).

4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS E TRIGLICERÍDEOS DE ÁCIDOS CÁPRICO E CAPRÍLICO COMO NÚCLEO OLEOSO

A determinação quantitativa de fármacos exige o uso de procedimentos analíticos validados para que os dados gerados sejam reprodutíveis e confiáveis (SHAH et al, 2000). Em função da importância na análise e controle de qualidade de matérias-primas e produtos farmacêuticos acabados, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a determinação do teor de fármacos têm recebido considerável atenção, principalmente por parte das agências regulatórias, como por exemplo, o FDA nos Estados Unidos e a ANVISA no Brasil. Esta última descreve os parâmetros de validação através da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Dentro deste contexto, buscou-se o desenvolvimento com posterior validação de metodologias para determinação de SDAg nas formulações de suspensões contendo o ativo na sua forma nanoencapsulada.

4.3.1 Linearidade: Curva de calibração

A Tabela 7 apresenta as áreas referentes às diferentes concentrações de SDaG, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em um comprimento de onda de 254 nm. As amostras foram analisadas seguindo a metodologia da farmacopéia americana (2007). O Desvio Padrão Relativo (DPR) médio obtido neste experimento foi de 2,6%, sendo este, inferior a 5%, limite máximo aceitável.

TABELA 7 – Valores referentes à construção da curva analítica da SDaG (n = 3).

Concentração (µg/ml)	Áreas			Médias ± DP	DPR (%)
5	98.742	91.082	99.125	96.316 ± 4,54	4,71
10	188.714	187.135	191.694	189.181 ± 2,32	1,22
15	277.807	279.404	295.249	284.153 ± 9,64	3,39
20	389.055	382.554	389.723	387.111 ± 3,96	1,02
25	475.829	458.977	486.075	473.627 ± 13,68	2,89

DP = Desvio Padrão

DPR (%) = Desvio Padrão Relativo

A Figura 8 representa a curva de calibração e a equação da reta obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para SDaG.

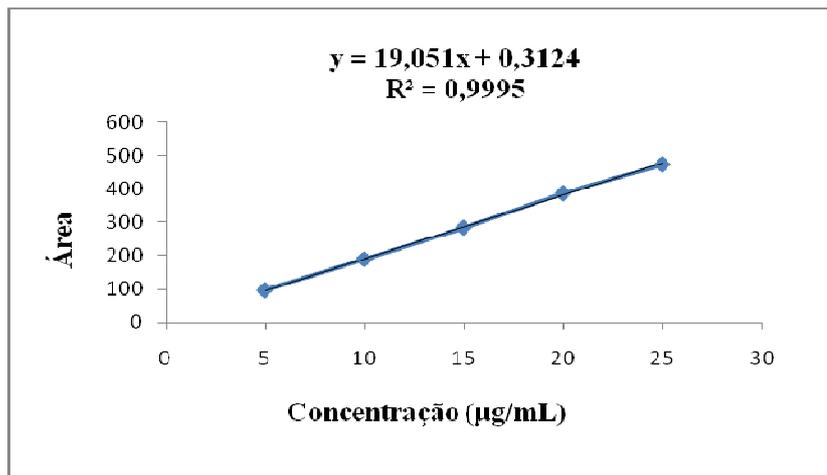


FIGURA 8 – Representação gráfica da curva analítica da sulfadiazina de prata.

Os valores foram tratados estatisticamente, através da análise de variância – ANOVA e encontram-se descritos na Tabela 8.

TABELA 8 – Análise de variância (ANOVA) correspondente às médias das áreas obtidas na determinação da curva de calibração da SDAg.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	F-calculado	F-tabelado
Entre amostras	4	272355.341663	68088.835415	628.3760	4,53*
Regressão linear	1	272206.022280	272206.02228	2512.126	5,99*
Desvio de linearidade	3	149.3193830	49.7731277	0.45934	4,76
Resíduo	6	650.1409560	108.3568260		
Total	14	273005.4826			

* Significativo para $p < 0,05$;

A curva de calibração da SDAg, apresentada na Figura 8 apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), não havendo desvio significativo da linearidade ($p > 0,05$). A equação da reta para o método foi: $y = 19,051x + 0,3124$; onde x é a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e y a área obtidos por CLAE, apresentando um coeficiente de correlação igual a 0,9995. O coeficiente de correlação é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI et al, 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99, e se todos os valores de correlação linear obtidos estão acima deste valor, sendo o método, portanto, considerado linear (BRASIL, 2003).

Os resultados demonstram que a curva pode ser utilizada para quantificar amostras de SDAg, conferindo a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

4.3.2 Repetibilidade e precisão

Repetibilidade é a concordância entre os resultados, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

A repetibilidade do método cromatográfico em estudo foi avaliada através do doseamento da SDAg em suspensões de nanocápsulas contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso, na concentração de trabalho correspondente a 15 $\mu\text{g/mL}$ em um único dia ($n = 6$) utilizando-se etanol e fase móvel (água, acetonitrila e água 900: 99: 1) como solventes.

Os resultados obtidos na avaliação da repetibilidade das amostras encontram-se descritos na Tabela 9.

TABELA 9 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação da SDAg nas suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (n = 6).

Amostra	Teor da SDAg		Média ± DP	DPR (%)
	µg/mL	(%)		
Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico	11,73	78,2	77,31 ± 2,504	3,24
	11,54	76,93		
	11,19	74,61		
	11,15	74,33		
	12,08	80,53		
	11,89	79,26		

O valor de DPR (%), preconizado para este estudo deve ser abaixo de 5%. O valor de desvio padrão relativo foi de 3,24 %, demonstrando que o método possui boa precisão para a quantificação de SDAg nas suspensões de nanocápsulas.

Os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária das amostras encontram-se na Tabela 10, sendo a concentração de trabalho de 15 µg/mL.

TABELA 10 – Valores experimentais para o ensaio de precisão intermediária da SDAg incorporada em suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.

Tempo (dias)	N	Analista 1		Analista 2		Média do dia (%)	DPR do dia (%)
		Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)	Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)		
1	1	11,73	78,2	11,1	74	77,2	3,43
	2	12,4	82,6	11,5	76,6		
	3	11,5	76,6	11,3	75,3		
2	1	11,4	76	11,0	73,3	74,7	2,24
	2	11,6	77,3	10,9	72,6		
	3	11,2	74,6	11,15	74,3		
Média do analista		77,5		74,4			
DP do analista		1,32		0,89			
DPR do analista		1,73		1,22			

* Não significativo para $p \geq 0,05$

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra. Os valores de DPR (Tabela 10) determinados foram todos abaixo do valor preconizado pela ANVISA, que é no máximo 5%, portanto o método pode ser considerado preciso sob as condições estabelecidas.

4.3.3 Exatidão

Os valores obtidos para os experimentos de exatidão do método por recuperação encontram-se descritos na Tabela 11.

TABELA 11 – Valores experimentais para o teste de exatidão da SDAg nas suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.

	Balão	Quantidade de SDAg ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação
		Concentração Teórica	Concentração obtida	
Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico	R1	12	11,74	97,9
	R2	15	14,99	99,92
	R3	18	18,69	103,82
MÉDIA				100,5

* R1; R2 e R3 (Soluções Amostra com adição de diferentes concentrações de solução padrão)

A exatidão é a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Para os valores descritos na Tabela 11 e apresentados na Figura 9, é possível observar que a porcentagem de recuperação variou de 97,9 a 103,82%, portanto todos os resultados foram satisfatórios, ou seja, todas as porcentagens de recuperação ficaram entre os limites preconizados, demonstrando dessa forma, uma boa exatidão do método e uma recuperação adequada.

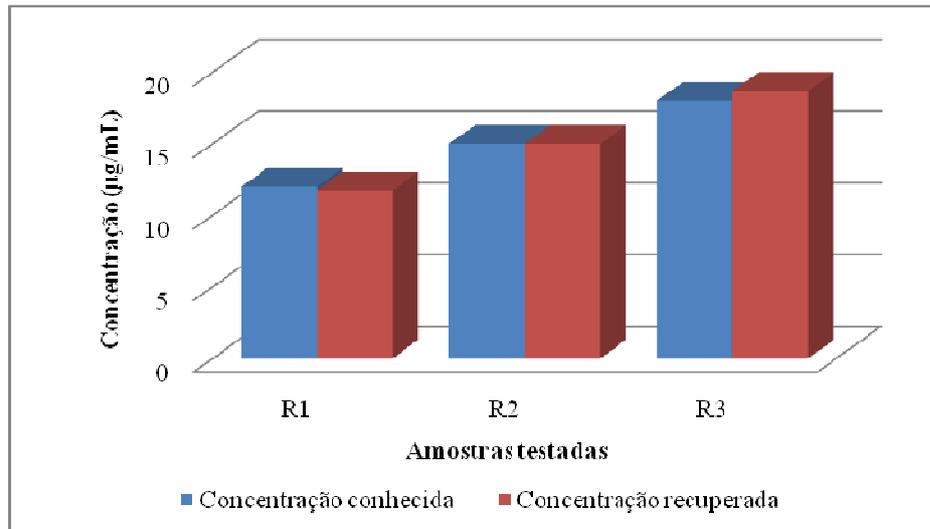


FIGURA 9 – Representação gráfica do teste de exatidão para a SDAg incorporada na suspensão com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.

4.3.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação de cromatogramas, verificando-se possível interferência dos excipientes contidos nas suspensões de nanocápsulas. As avaliações foram feitas para as amostras de suspensões de nanocápsula sem SDAg com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

Pode-se observar que não houve nenhuma interferência de excipientes da suspensão no comprimento de onda onde estão sendo realizados os experimentos (254 nm), indicando desta forma, que o método utilizado é específico para o doseamento de SDAg nas suspensões.

4.3.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção e de quantificação foi calculado utilizando-se o quadrado médio do resíduo. Valores esses retirados da curva analítica. O limite de detecção encontrado foi de 0,0318 µg/mL e o de quantificação de 0,106 µg/mL, demonstrando uma boa sensibilidade do método.

4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE SULFADIAZINA DE PRATA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS COM COCOATO DE BUTILENOGLICOL NO NÚCLEO OLEOSO.

4.4.1 Repetibilidade e precisão

A repetibilidade foi avaliada através do doseamento da SDAg em suspensões de nanocápsulas, na concentração de trabalho correspondente a 15 µg/mL em um único dia (n = 6).

Os resultados obtidos na avaliação da repetibilidade das amostras encontram-se descritos na Tabela 12.

TABELA 12 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação da SDAg nas suspensões de nanocápsula com cocoato de butilenoglicol (n = 6).

Amostra	Teor da SDAg		Média ± DP	DPR (%)
	µg/mL	(%)		
Cocoato de butilenoglicol	6,19	41,26	38,5 ± 2,69	6,98
	6,23	41,53		
	5,74	38,26		
	5,76	38,38		
	5,14	34,27		
	5,60	37,33		

O valor médio de desvio padrão relativo foi de 6,98 %, demonstrando estar acima do valor preconizado (5%), portanto o método não foi preciso para a quantificação de SDAg nas suspensões de nanocápsulas.

Os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária das amostras encontram-se na Tabela 13, sendo a concentração de trabalho de 15 µg/mL.

TABELA 13 – Valores experimentais para o ensaio de precisão intermediária da SDAg incorporada em suspensões de nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

Tempo (dias)	N	Analista 1		Analista 2		Média do dia (%)	DPR do dia (%)
		Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)	Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)		
1	1	8,07	53,8	7,0	47	50,7	6,95
	2	8,38	55,9	7,1	47,3		
	3	7,6	50,7	7,5	50		
2	1	5,8	39	5,1	34	34,3	10,41
	2	5,2	35	4,5	30		
	3	5,6	37,3	4,6	30,6		
Média do analista		45,28		39,8			
DP do analista		9,2		9,23			
DPR do analista		20,32		23,2			

* Não significativo para $p \geq 0,05$

Os resultados de DPR foram superiores a 5%, demonstrando que o método não é preciso sob as condições estabelecidas (Tabela 13).

4.4.2 Exatidão

Os valores obtidos para os experimentos de exatidão do método por recuperação encontram-se descritos na Tabela 14.

TABELA 14 – Valores experimentais para o teste de exatidão da SDAg nas suspensões de nanocápsulas contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

	Balão	Quantidade de SDAg (µg/mL)		Recuperação
		Concentração Teórica	Concentração obtida	
Cocoato de butilenoglicol	R1	12	7,67	63,92
	R2	15	13,22	88,11
	R3	18	16,92	94,02
MÉDIA				82,02

* R1; R2 e R3 (Soluções Amostra com adição de diferentes concentrações de solução padrão)

Para os valores descritos na Tabela 14 e apresentados na Figura 10, é possível observar que todos os resultados ficaram fora dos limites preconizados. Valores na faixa de 98% a 102% (ICH, 1996).

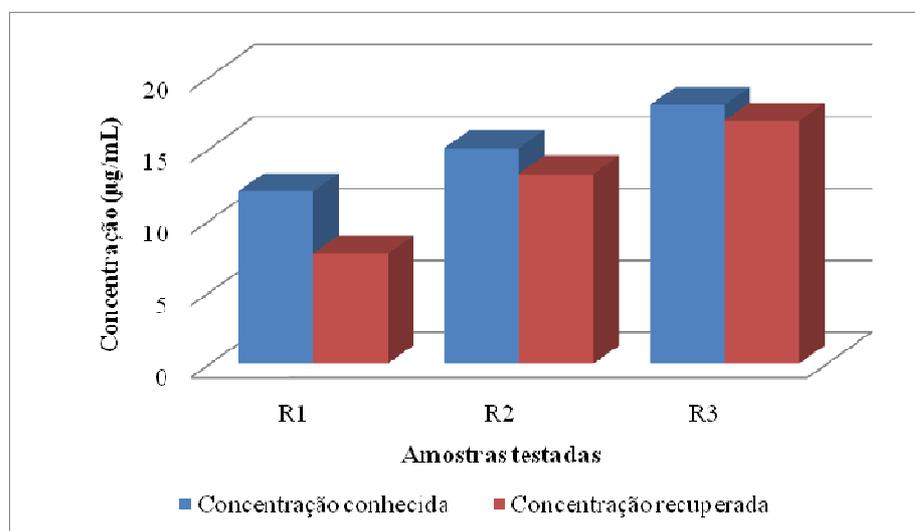


FIGURA 10 – Representação gráfica do teste de exatidão para a SDAg incorporada na suspensão com cocoato de butilenoglicol.

4.4.3 Especificidade

O método também se mostrou específico, uma vez que, no cromatograma da suspensão de nanocápsula sem a SDAg e com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso não detectou absorção no tempo de retenção correspondente ao pico da SDAg.

O doseamento das suspensões de nanocápsulas contendo SDAg com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso não foi validado, pois nos parâmetros analisados, os resultados não atenderam as especificações de linearidade, precisão e exatidão.

Conforme os resultados demonstrados no doseamento das suspensões contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso, a recuperação demonstrou valores baixos, provavelmente devido a formação de complexos de SDAg com os constituintes da formulação durante o processo de extração.

4.5 ANÁLISE DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Os bioensaios são procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopêicas utilizando reagentes biológicos,

tais como microrganismos, animais, fluídos biológicos, tecidos e órgãos isolados de animais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Neste mesmo contexto, a atividade de fármacos antibióticos pode ser determinada, sob condições apropriadas, medindo-se a inibição do crescimento de um microrganismo sensível induzida por concentrações conhecidas do antibiótico sob teste em comparação com uma substância de referência com atividade reconhecida (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

As condições experimentais para desenvolvimento do ensaio microbiológico para avaliação de potência das suspensões de nanocápsulas contendo SDAg foram testadas e ajustadas para proporcionar um bom desempenho do método. A cepa do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 apresentou-se adequada em função da sua sensibilidade ao antibiótico e da capacidade para formar halos de inibição de crescimento bem definidos, permitindo medidas precisas destes halos. Além de ser recomendada pelo NCCLS para ser usada como controle de qualidade para a susceptibilidade de sulfonamidas.

A Figura 11 apresenta uma placa de ágar preparada durante a fase inicial de determinação das condições experimentais para desenvolvimento do ensaio microbiológico. A placa foi preparada nas mesmas condições descritas por Ragonha e colaboradores (2005), na qual testou-se as doses de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL de suspensão de nanocápsulas com SDAg.

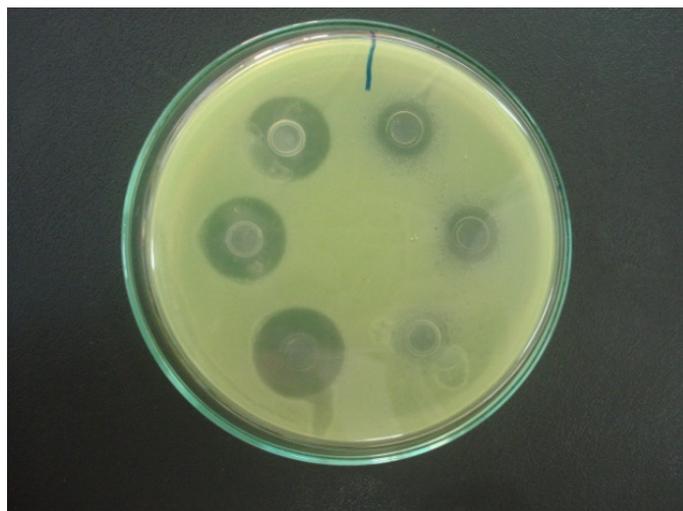


FIGURA 11 - Fase de definição das condições experimentais do ensaio microbiológico de difusão em ágar. Teste de diluições da amostra de nanocápsulas de sulfadiazina de prata nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL em placa contendo 20 mL de ágar Müller Hinton inoculada a 1% (v/v) com suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ajustada a $25 \pm 2\%$ de transmitância.

Para a realização do método, existe a possibilidade de adotar diferentes delineamentos experimentais nos compêndios oficiais e Farmacopéias que incluem ensaios de doseamento microbiológico de antibióticos, os delineamentos balanceados 3x3 e 2x2 são adotados pelas Farmacopéias Brasileira e Britânica, enquanto que a Farmacopéia Americana apresenta o delineamento 5x1 para o doseamento de antibióticos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

O ensaio microbiológico descrito neste trabalho foi executado usando o delineamento experimental de linhas paralelas 3x3, ou seja, três doses do padrão com concentrações em progressão geométrica e três doses da amostra com concentrações teoricamente semelhantes à substância de referência. Em uma mesma placa estão dispostos alternadamente os 3 níveis de doses do padrão e da amostra (Figura 12).

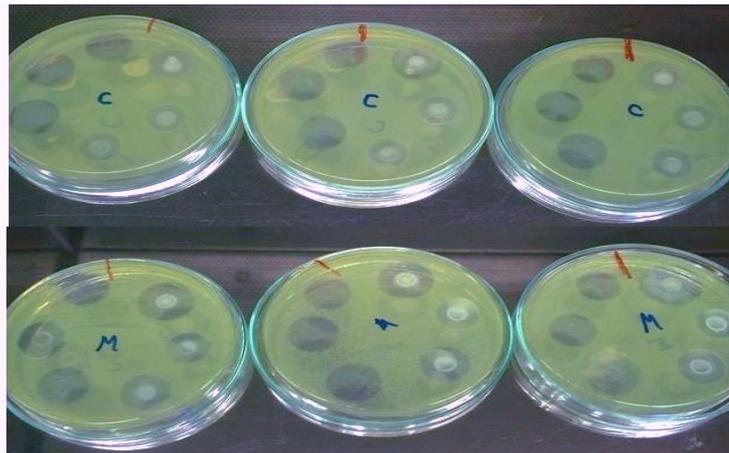


FIGURA 12 – Delineamento experimental 3x3 utilizado no ensaio de difusão em ágar. Camada de ágar inoculada com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e diluições do padrão de sulfadiazina de prata nas concentrações teóricas de 100; 200 e 300 µg/mL e da amostra nas concentrações de 100; 200 e 300 µg/mL, em triplicada.

O método microbiológico avalia a capacidade de um dado microrganismo de se multiplicar na presença de concentrações presumíveis de um antimicrobiano aplicado no interior de um cilindro sobre uma camada de ágar em uma placa de petri. O antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes, e a cepa bacteriana semeada cresce até encontrar a concentração inibitória mínima, e a partir do ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro. Esse halo é determinado em milímetros e é diretamente proporcional à concentração do antimicrobiano (ESMERINO et al, 2004).

Para a construção da curva de calibração do ensaio proposto, os diâmetros médios experimentais dos halos e o desvio padrão relativo obtido para as soluções de referência foram: 16,09 mm (DPR = 4,6 %); 17,79 mm (DPR = 0,69 %); 19,07 (0,29 %) para doses de 100, 200 e 300 µg/mL, respectivamente. (Tabela 15).

TABELA 15 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a curva-padrão da solução de referência da SDAg.

Concentração (µg/mL)	Diâmetro dos halos (mm)	Diâmetro médio dos halos ± DP (mm)	DPR (%)
100	16,64	16,09 ± 0,74	4,60
	16,39		
	15,25		
200	17,66	17,79 ± 0,12	0,69
	17,90		
	17,82		
300	19,02	19,07 ± 0,06	0,29
	19,07		
	19,13		

A curva de calibração para o ensaio da SDAg foi gerada pelo gráfico do logaritmo das concentrações das doses (µg/mL) contra o diâmetro do halo de inibição de crescimento (mm) e demonstrou boa linearidade na faixa de 100, 200 e 300 µg/mL (Figura 13). A equação linear encontrada foi $y = 0,0149x + 14,673$. Os coeficientes de correlação ($r = 0,9934$) foram significativos para o método proposto.

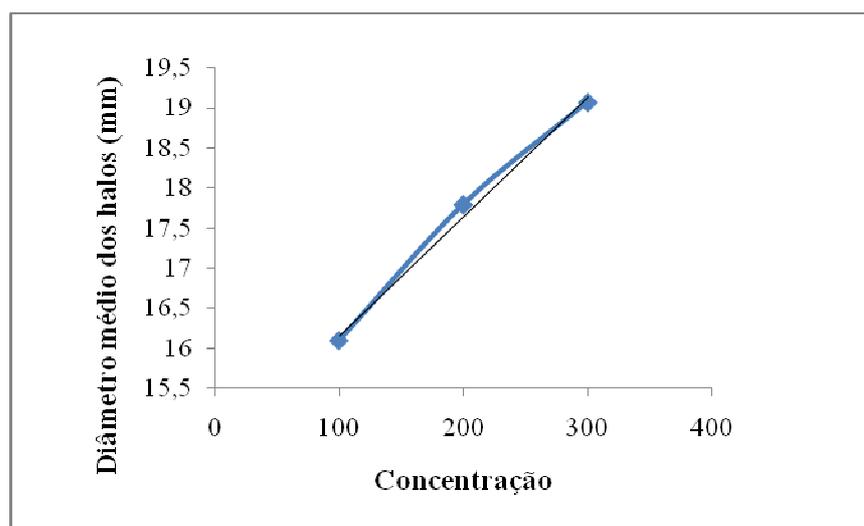


FIGURA 13 - Curva padrão do ensaio microbiológico da sulfadiazina de prata.

Para o doseamento das suspensões de nanocápsulas contendo SDAg, tanto com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como cocoato de butilenoglicol, as amostras e o padrão foram preparados nas mesmas concentrações (100 a 300 $\mu\text{g/mL}$), usando como diluente DMSO e água (1:1).

Na Tabela 16 estão os halos de inibição obtidos pelas diferentes concentrações das suspensões de nanocápsulas com SDAg.

TABELA 16 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro médio dos halos \pm DP (mm)	DPR (%)
100	15,72 \pm 0,37	2,34
200	17,43 \pm 0,74	4,22
300	22,03 \pm 1,06	4,80

O gráfico (Figura 14) do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão de nanocápsulas com SDAg demonstrou boa linearidade na faixa de 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$.

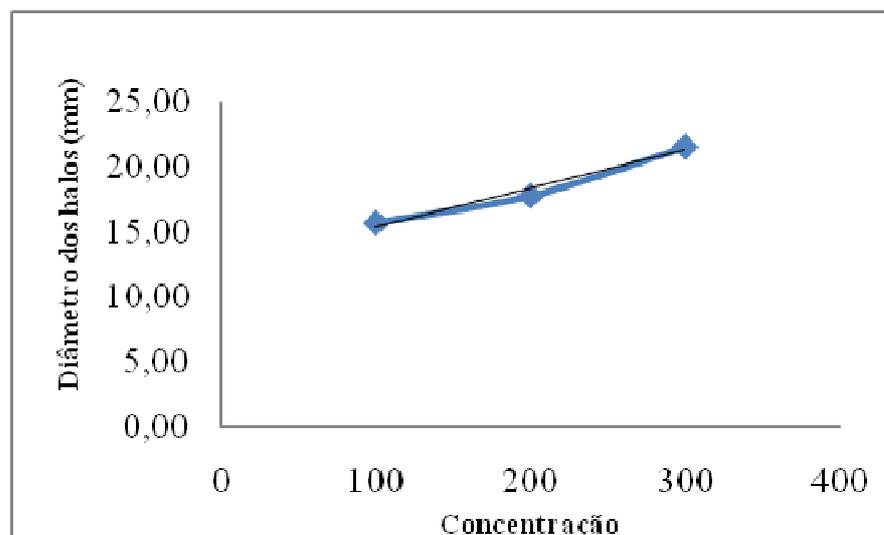


FIGURA 14 – Gráfico do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão de nanocápsulas com SDAg com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

A potência determinada na suspensão de nanocápsula contendo SDAg com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso foi de 92,4%, conforme a Tabela 17.

TABELA 17 – Resultado da determinação da potência da suspensão de nanocápsula com SDAg e triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (n = 3).

	Halos (mm)	[] $\mu\text{g/mL}$	Teor %	Média dos teores %
200 $\mu\text{g/mL}$	16,71	187,85	93,93	97,96
	18,18	204,38	102,19	
	17,39	195,5	97,75	

Na Tabela 18 estão os halos de inibição obtidos pelas diferentes concentrações das suspensões de nanocápsulas contendo SDAg com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

TABELA 18 – Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento obtidos para a suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro médio dos halos \pm DP (mm)	DPR (%)
100	14,26 \pm 0,52	3,61
200	15,52 \pm 0,20	1,28
300	19,86 \pm 0,73	3,66

Da mesma forma que o gráfico da suspensão de nanocápsulas com SDAg contendo triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, o gráfico do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão contendo cocoato de butilenoglicol demonstrou boa linearidade na faixa de 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$, conforme mostra a Figura 15.

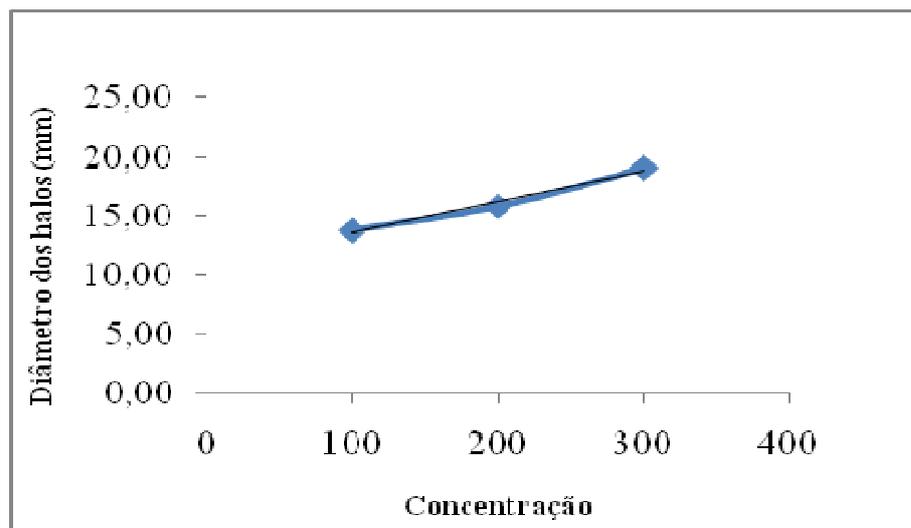


FIGURA 15 – Gráfico do diâmetro dos halos versus as diferentes concentrações da suspensão de nanocápsulas com SDAg com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso.

A potência determinada na suspensão de nanocápsula contendo SDAg com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso foi de 87,26 % conforme a Tabela 19.

TABELA 19 – Resultado da determinação da potência da suspensão de nanocápsula com SDAg e cocoato de butilenoglicol (n = 3).

	Halos (mm)	[] µg/mL	Teor %	Média dos teores %
	15,38	172,90	86,45	
200 µg/mL	15,44	173,58	86,79	87,26
	15,75	177,06	88,53	

Os avanços recentes no campo da nanotecnologia, especialmente na capacidade de desenvolver nanopartículas altamente ordenadas em qualquer forma e tamanho, levaram ao desenvolvimento de novos agentes bactericidas. Estudos anteriores demonstram que as formulações antimicrobianas na forma de nanopartículas podem ser usadas como antimicrobianos eficazes (JONES et al, 2008). Santos-Magalhães e colaboradores (2000) formularam nanoemulsão e nanocápsulas com penicilina G que mostraram 100% de inibição no crescimento contra *Streptococcus pyogenes*. Dillen e colaboradores (2002) desenvolveram nanopartículas com ciprofloxacina encapsuladas com PLGA, a qual mostrou que mesmo que a droga não tenha sido incorporada 100% nas nanocápsulas, demonstraram uma boa atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

As atividades funcionais (químicas, biológicas ou catalíticas) das nanopartículas são fortemente influenciadas pelos tamanhos das partículas (LEWIS; KLIBANOV, 2005; ROSI; MIRKIN, 2005). Em estudos com nanopartículas de óxido de zinco, Jones e colaboradores (2008) observaram que nanopartículas com tamanhos menores inibiam 95% do crescimento bacteriano e nanopartículas maiores inibiam apenas 40 a 50% das bactérias.

As suspensões de nanocápsulas contendo SDAg com ambos os óleos (triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico e cocoato de butilenoglicol) apresentaram uma boa atividade antimicrobiana contra o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, em comparação com o padrão.

Em relação ao tamanho dos halos, pode-se observar que o padrão demonstrou maior halo de inibição nas duas primeiras doses, entretanto na dose onde as suspensões de nanocápsulas de SDAg não foram diluídas os halos de inibição, de ambas as suspensões, foram maiores que o da dose do padrão, demonstrando ser mais efetiva, nessa concentração de 300 µg/mL, que o padrão.

5 CONCLUSÃO

Foi possível obter suspensões de nanocápsulas contendo SDAg na concentração de 0,3 mg/mL, utilizando triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso e suspensões de nanocápsulas utilizando cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso, através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado.

As suspensões de nanocápsulas contendo SDAg, utilizando triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso, apresentaram diâmetro médio de partícula em torno de 225 nm, índice de polidispersão menores que 0,2, potencial zeta de -26 mV e valores de pH em torno de $5,6 (\pm 0,2)$; as suspensões de nanocápsulas contendo SDAg utilizando cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso apresentaram diâmetro médio de partícula em torno de 221 nm, índice de polidispersão menores que 0,15, potencial zeta de $-27,9$ mV e valores de pH em torno de $5,63 (\pm 0,06)$.

A suspensão de nanocápsulas contendo SDAg utilizando triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso apresentou um teor acima de 77% e taxa de associação de aproximadamente 99%, sendo que as suspensões contendo cocoato de butilenoglicol não foi possível estimar o teor médio de SDAg, pois a metodologia empregada (CLAE) neste estudo não foi adequada para quantificar SDAg após a destruição das nanocápsulas com os solventes utilizados, provavelmente devido a interferência dos constituintes da suspensão. Os resultados comprovaram que o processo de extração da SDAg utilizado é mais eficiente para a suspensão de nanocápsula com triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso.

A validação de metodologia apresentou valores satisfatórios para todos os parâmetros analisados, demonstrando que o método de doseamento da SDAg pela técnica de CLAE é válido e pode ser reprodutível para as suspensões que utilizaram triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico como núcleo oleoso. Já as suspensões preparadas com cocoato de butilenoglicol como núcleo oleoso não apresentaram valores satisfatórios para os parâmetros analisados, demonstrando que o método não é reprodutível, portanto não pôde ser validado.

Os resultados obtidos comprovam que o método microbiológico é adequado para a avaliação da atividade da SDAg nas suspensões de nanocápsulas frente ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

A suspensão com triglicérides de ácido cáprico e caprílico apresentou teor de 97,96 % e a suspensão com cocoato de butilenoglicol apresentou teor de 87,26%, sendo ambos os resultados satisfatórios, demonstrando atividade das nanocápsulas frente o microrganismo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, F.; ARNOLD, J. J.; MEEZAN, E.; PILLION, D. J.; Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 251, p. 195 – 203, 2002.

AL-ADHAM, I. S. I; KHALIL, E.; AL-HMOUD, N. D.; KIERANS, M.; COLLIER, P. J.; Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. **Journal Applied of Microbiology**. v. 89, n. 1, p. 9 – 32, 2000.

ALONSO, M. J.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoarylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 68, p. 69 – 76, 1991.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, N.; GUY, R. H.; FESSI, H.; Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 10, p. 1818 - 1825, 2004.

ALVES, M. P., SCARRONE, A. L., SANTOS, M., POLHMANN, A. R., GUTERRES, S. S.; Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215 – 220, 2007.

AMMOURY, N.; DUBRASQUET, M.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. BENITA, S. Indomethacin-load poly (^LD – lactide) nanocapsule protection from gastrointestinal ulceration and anti-inflammatory activity evaluation in rats. **Clinical Materials**, v. 13, p. 121 – 130, 1993.

AZEVEDO, A. M. Z.; MACHADO, M. J.; CHASSOT, G. C.; Assistência de enfermagem nos pacientes queimados com curativo aberto na unidade de internação. **Revista Técnico-Científica do Grupo Hospitalar Conceição**, v. 15, n. 2, p. 54 – 59, 2002.

BHATTARAI, N.; RAMAY, H. R.; CHOU, S. H.; ZHANG, M.; Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolong drug. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 181 - 187, 2006.

BORGES, A. D. L.; PONTE, G.; NETO, A., F.; CARVALHO, I.; Síntese de sulfadizina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: Prática experimental em síntese de fármacos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 727 - 731, 2005.

BORGES, F. S.; Estrutura da pele IN: **Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. São Paulo: Phorte, 2006, Cap. 4, p. 101 – 105.

BORREN, A. L.; ARNOLD, W. A.; Mc NEILL, K.; Triplet-sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: identification of an SO₂ extrusion photoproduct. **Environ Science Technology**. v. 15, n. 10, p. 3630 – 3638, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office. v. I – II, 2008.

CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O.; WINSTON, B.; LINDSAY, R.; Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 403 - 434, 2006.

CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute, Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15^o Suplemento Informativo. M2-A8 e M7-A6, 2002.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; RIBEIRO, M. C. A. P.; LEONARDI, G. R.; PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M.; POLACOW, M. L. O.; Avaliação histológica da pele após exposição à gel acrescido de hialuronidase associado ou não a ultra-som. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 26 – 30, 2007.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C.; Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p. 99 – 134, 2002.

DALECON, F.; AMJAUD, Y.; LAFFORGUE C.; DEROUIN, F.; FESSI, H. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. **International Journal Pharm**, v. 153, p. 127 - 130, 1997.

DINGLER, A.; BLUM, R. P.; NIEHUS, H.; MULLER, R. H.; GOHLA, S.; Solid lipid nanoparticles (SLNTM/ lipopearls TM) – a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal Microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 751 – 767, 1999.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; SCHELESKY, M. E.; Doseamento da potência da coprofloxacin em comprimidos orais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 17 – 20, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4th ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L., A.; ANDRADE, D.; Curativo do paciente queimado: Uma revisão de literatura. **Revista escolar de enfermagem da USP**, v. 37, n. 1, p. 44 - 51, 2003.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.; AMMOURY, N.; BENITA, S.; Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1 – 4, 1989.

FISHER, N. M.; MARSH, E.; LAZOVA, R.; Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. **Journal American Academy of Dermatology**. v. 49, n. 4, p. 730 – 732, 2003.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G.; Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, p. 301 - 313, 2005.

FOROUTAN, S. M., ETTEHADI, H. A, TORABI, H. R.; Formulation and in vitro evaluation of silver sulfadiazine spray. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1, p. 47 – 49, 2002.

FU, X.; FENG, F.; HUANG, B.; Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 171 – 175, 2006.

GANACHAUD, F.; KATZ, J. L.; Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **Chemphyschem**, v. 6, n. 2, p. 209 – 216, 2005.

GEAR, A., J., L.; HELLEWELL, T. B.; WRIGHT, H., R.; MAZZARESE, P., M.; ARNOLD, P., B.; RODEHEAVER, G., T.; EDLICH, R., F.; A new Silver Sulfadiazine water soluble gel. **Burns**, v. 23, n. 5, p. 387 – 391, 1997.

GEENHALGH, K.; TUROS, E.; In vivo studies of polyacrylate nanoparticle emulsion for topical and systemic applications. **Nanomedicine: Biology, and Medicine**, 2008.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; ARAÚJO, D. R.; PAULA, E.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; Validation of an HPLC method for quantitative determination of benzocaine in PHBV-microparticles and PLA-nanoparticle. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 393 – 399, 2009.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57 – 63, 1995.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indometacin. **Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 195 – 199, 2000.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsulas for cutaneous applications. **Drug target insight**. v. 2, p. 147 – 157, 2007.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M.; Biodegradable nanoparticle for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319 – 327, 2002.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: Text and Methodology - Q2(R1)** - Current *Step 4* version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005). ICH Steering Committee. Commission of the European Communities, Geneva, 2005. Disponível em: < <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> >. Acesso em: 01 de novembro de 2005.

IWASAKI, S.; YOSHIMURA, A.; IDEURA, T. KOSHIKAWA, S.; SUDO, M.; Elimination study of silver in a hemodialyzed burn patient treated with silver sulfadiazine cream. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 30, n. 2, p. 287 – 290, 1997.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297 – 305, 2007.

JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, J., M.; OMRAY, P.; KHANDELWAL, S.; PAKNIKAR, K., M.; Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388 – 1401, 2009.

JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C.; Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms, **FEMS – Microbiology Letters**, v. 279, p. 71 – 76, 2008.

JOO, H. H.; LEE, H. Y.; GUAN, Y. S.; KIM, J. C.; Colloidal stability and in vitro permeation study of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing hinokitiol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, p. 608 – 613, 2008.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H.; Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1; p. 95 - 101, 2007.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F., F., A., C.; Antiinfeciosos. IN: **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 15 ed. Rio de Janeiro, 2008. Cap. 18, p. 18 – 18.105.

KUNKELY, H.; VOGLER, A.; Photoproperties of silver sulfadiazine. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 10, p. 226 – 228, 2007.

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

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; Polymeric nanocapsules a drug delivery systems A review. S.T.P. **Pharma Sciences**, v.9, n. 5, p. 411 – 418, 1999.

LEWIS, K.; KLIBANOV, A. M.; Surpassing nature: rational desing of sterile-surface materials. **Trends Biotechnology**, v. 23, p. 343 – 348, 2005.

LICHTENSTEIN, A.; MARGALIT, R.; Liposome-encapsulated silver sulfadiazine (SSD) for the topical treatment of infected burns: thermodynamics of drug encapsulation and kinetics of drug release. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 60, p. 187 – 198, 1995.

LOPES, E.; POHLMANN, A. R.; BASSINI, V.; GUTERRES, S. S.; Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 55, p. 527 - 530, 2000.

LOSA, C.; ALONSO, M. J.; VILA, J. L.; ORALLO, F.; MARTINEZ, J.; SAAVEDRA, J. A.; PASTOR, J. C.; Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules. **Journal of Ocular Pharmacology**. v. 8, n. 3, p. 191 – 198, 1992.

MA, J.; FENG, P.; YE, C.; WANG, Y.; FAN, Y.; An improves interfacial concervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers with poly(ethylene glycol). **Colloid Polymeric Science**. v. 279, p. 387 – 392, 2001.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221 – 241, 1991.

MARCHAIS, H.; BENALI, S.; IRACHI, J. M.; THARASSE-BLOCH, C.; LAFONT, O.; ORECCHIONI, M.; Entrapment efficiency and initial release of phenylbutazone from nanocapsules prepares from different polyesters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 24, n. 9, p. 883 – 888, 1998.

MODAK, S. M.; FOX, C. L. J.; Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 19, p. 2391 – 2404, 1973.

MONTAGNER, D.; CORRÊA, G. M.; Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 3, p. 69 – 72, 2004.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; Poly(D, L – Lactide) nanocapsules prepares by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 89, n. 5, p. ,2000.

MÜLLER-GOYMAN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles of topical administration. **European Journal of Pharmaceuticals Biopharmaceuticals**, v. 58, p. 343 – 346, 2004.

NASCIMENTO, E. G.; SAMPAIO, T. B. M.; MEDEIROS, A. C.; AZEVEDO, E. P.; Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 24, n. 6, p. 460 – 465, 2009.

OHARA, M.T; KANEKO, T.M; PINTO, T.J. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**, 2 ed. São Paulo: Ateneu, 2003.

OLIVEIRA, T. A.; PAIXÃO, F. G.; PRESTES, P. S.; CAMPOS, M. S. M. P.; POLACOW, M. L. O.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; NASCIMENTO, G. G. F. Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas nanoestruturados. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 878 – 882, 2007.

PATEL, P. P.; VASQUEZ, S. A.; GRANICK, M. S.; RHEE, S. T.; Topical antimicrobials in pediatric burn wound management. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 4, p. 913 - 922, 2008.

PEREIRA, M. S.; SILVA e SOUZA, A. C.; TIPPLE, A. F. V.; DAMACENO, A. P.; CASTRO, K.; Assistência hospitalar ao paciente portador de queimaduras na perspectiva do controle de infecção: Um estudo de caso. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 4, n. 1, p. 40 - 50, 2002.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrintestinal em ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163 – 172, 2003.

RAGONHA, A. C. O.; FERREIRA, E.; ANDRADE, D.; ROSSI, L. A.; Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 13, p. 514 – 521, 2005.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F.; Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 53 - 65, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. B.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A.; Nanostructures in biodiagnostics. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1547 – 1562, 2005.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M.; CAETANO, M. N.; Coloidal carries for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71 – 80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S.; Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonariense**, v. 21, n. 2, p. 99 – 106, 2002.

SCHAFFAZICK, R.; GUTERRES, S.; FREITAS, L.; POHLMANN, A.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726 - 737, 2003.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. H.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. P.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A.; Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.12, p.1551 - 1557, 2000.

SHAHVERDI, A. R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, S.; Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 168 - 171, 2007.

SHERIDAN, R., L.; Sepsis in pediatric burn patients. **Pediatric Critical Care medicine**, v. 6, n. 3, p. 112 - 119, 2005.

SODRÉ, C., T.; AZULAY, D., R.; AZULAY, R.,D.; A pele – Estrutura, fisiologia e embriologia. IN: AZULAY, R., D.; AZULAY, D., R.; **Dermatologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, 2006. Cap. 1, p. 1 – 15.

SPANN, C., T.; TAYLOR, S., C.; WEINBERG, J., M.; Topical antimicrobial agents in dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 21, p. 407 – 421, 2004.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J. M., CATTEL, L.; COUVREUR, P.; Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanocrylate nanospheres and nanocapsule. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 344, p. 71 – 77, 2007.

TAVANO, L.; MUZZALUPO, R.; CASSANO, R.; TROMBINO, S. FERRARELLI, T.; PICCI, N.; New sucrose cocoate based vesicles: Preparation characterization and skin permeation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, p. 319 – 322, 2010.

THE INDEX MERCK. 30th ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, Merck&CO., INC. 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

TOMA, H. E.; Interfaces e organização da pesquisa no Brasil: da química à nanotecnologia. **Química Nova**. v. 28, p. 48 – 51, 2005.

TROTT, D. J.; MOSS, S. M.; SEE, A. M.; REES, R.; Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin silver sulfadiazine. **Australian Veterinary Journal**. v. 85, n. 11, p. 464 – 466, 2007.

VITALE, S. A.; KATZ, J. L.; Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: “The ouzo effect”. **Langmuir**, v. 19, n. 10, p. 4105 – 4110, 2003.

VOGLER, A.; KUNKELY, H.; Photoluminescence of tetrameric silver (I) complexes. **Chemical Physics Letters**. v.158, p. 74 – 76, 1989.

ZADEH, B. S. M.; MOGHIMI, H.; Effect of hydration on barrier performance of third-degree burn eschar. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 155 – 161, 2006.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H.; Preparation and characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261 – 267, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)