

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cristina Rigon

**HIDROGEL DE BASE NANOTECNOLÓGICA CONTENDO SILIBININA
COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NO MODELO DE ÓLEO DE
CRÓTON**

Santa Maria, RS
2018

Cristina Rigon

**HIDROGEL DE BASE NANOTECNOLÓGICA CONTENDO SILIBININA COM
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NO MODELO DE ÓLEO DE CRÓTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Cruz

Santa Maria, RS
2018

RIGON, CRISTINA

HIDROGEL DE BASE NANOTECNOLÓGICA CONTENDO SILIBININA
COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NO MODELO DE ÓLEO DE CRÓTON /
CRISTINA RIGON.- 2018.

129 p.; 30 cm

Orientadora: LETÍCIA CRUZ

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Desenvolvimento de hidrogel contendo nanocápsulas
de silibinina 2. Estudos de permeação cutânea da
silibinina 3. Estudo da capacidade bioadesiva 4.
Avaliação da performance do hidrogel no modelo de óleo de
cróton 5. Análises biométricas em voluntários saudáveis
I. CRUZ, LETÍCIA II. Título.

Cristina Rigon

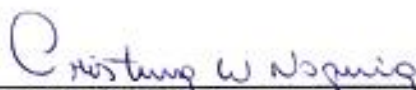
**HIDROGEL DE BASE NANOTECNOLÓGICA CONTENDO SILIBININA
COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NO MODELO DE ÓLEO DE
CRÓTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

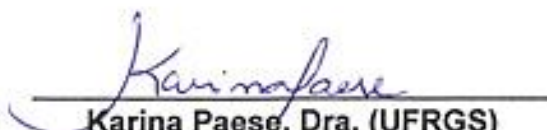
Aprovado em 30 de novembro de 2018:



Leticia Cruz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM)



Karina Paese, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar minhas escolhas, por ser meu sustento em todos os momentos e por me proporcionar tantas oportunidades de amadurecimento.

Aos meus pais, meus melhores amigos, pelo amor, suporte e incentivo que foram essenciais para seguir em frente, sempre me conduzindo pelo caminho da fé, da honestidade e da dedicação aos nossos objetivos.

A minha irmã, Letícia, que é meu porto seguro, obrigada por todo o carinho, amizade, força e me encorajar a seguir sempre em frente.

Ao meu noivo, Felipe, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, trazendo tranquilidade e mais amor aos meus dias.

Aos meus avós, tios e primas pelo incentivo nos meus estudos.

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª. Letícia Cruz, pessoa que tenho como exemplo profissional, sempre amável e generosa. Obrigada pela amizade, todos os ensinamentos compartilhados e pela confiança em me permitir participar de seu grupo de pesquisa que tanto contribuiu para minha formação.

À Fernanda, pelo auxílio e dedicação durante os experimentos.

À Marila, por todo o conhecimento dividido, pela amizade que construímos e pela conversa sempre enriquecedora.

À Prof^ª. Scheila Rezende Schaffazick por todas as contribuições e ensinamentos transmitidos ao longo dos anos.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela amizade, aprendizado, ajuda e pelos bons momentos vivenciados.

Aos meus queridos amigos, pelo companheirismo, compreensão e momentos de descontração que tornam tudo mais leve.

Agradeço à Prof^ª. Aline Ourique e a aluna Maiara Velho pela parceria e empenho na realização dos testes de biometria cutânea, bem como a Universidade Franciscana pelo empréstimo dos equipamentos. À Prof^ª. Sara Marchesan e sua aluna Natháli Pegoraro, pelo experimento *in vivo* e a dedicação, auxiliando-me em cada dúvida e curiosidade. Ao Prof. Ruy Beck e a Paula Chaves (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) parceiros na realização do estudo de bioadesão, pela disponibilidade e atenção em sempre sanar qualquer dúvida.

Ao Marcel, pelo auxílio, generosidade e conhecimento dividido, além das palavras de incentivo.

Também agradeço a Prof^a. Cristiane de Bona pelo empréstimo do equipamento ZetaSizer.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e a CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

HIDROGEL DE BASE NANOTECNOLÓGICA CONTENDO SILIBININA COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NO MODELO DE ÓLEO DE CRÓTON

AUTORA: Cristina Rigon
ORIENTADORA: Letícia Cruz

Atualmente, a dermatite de contato irritativa é a dermatite mais prevalente entre as demais e é desencadeada pela ativação da imunidade inata, após o contato da pele com agentes irritantes. A silibinina (SB), um ativo de ocorrência natural, apresenta atividades benéficas para o tecido cutâneo, dentre as quais pode-se destacar a ação anti-inflamatória. Desta forma, em estudos realizados no nosso grupo de pesquisa, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas contendo óleo de romã como núcleo oleoso e silibinina como ativo. Visando a aplicação na pele, esta dissertação objetivou desenvolver um hidrogel bioadesivo inovador para a veiculação desta suspensão de NC e verificar seu potencial no tratamento da dermatite de contato irritativa. O hidrogel foi preparado a partir do polímero Pemulen® TR2, que apresenta características bioadesivas. As formulações foram caracterizadas quanto ao teor de SB, pH, tamanho e distribuição das partículas, bem como espalhabilidade e reologia, características importantes principalmente no desenvolvimento de novos produtos para administração cutânea. Para os estudos de liberação da SB a partir dos hidrogéis e permeação cutânea do ativo em pele humana utilizou-se células de *Franz*. O teste de bioadesividade foi realizado utilizando um texturômetro e, visando garantir a segurança das formulações, o ensaio de biometria cutânea foi executado, avaliando-se os parâmetros de eritema, pH, perda transepidermal de água e hidratação cutânea. Ainda, considerando a capacidade da SB em regular eventos inflamatórios, estudou-se a viabilidade destes hidrogéis no tratamento da inflamação em um modelo animal induzido por óleo de cróton. A formulação proposta apresentou características físico-químicas compatíveis com a administração tópica, mantendo o tamanho nanométrico após a incorporação nos hidrogéis (184 ± 26 nm), faixa de pH adequada ($6,70 \pm 0,15$), concentração de SB próxima a concentração teórica ($0,99 \pm 0,01$ mg/g), assim como comportamento não-newtoniano pseudoplástico. A liberação *in vitro* evidenciou que os hidrogéis que continham as nanocápsulas proporcionaram uma menor retenção da silibinina na forma farmacêutica tanto para o meio contendo tampão fosfato pH 5,5 acrescido de etanol como para o meio apenas com tampão ($4,73 \pm 0,50$ µg/mL para o HP-NCSB e $1,14 \pm 0,18$ µg/mL para o HP-SB e $2,25 \pm 0,25$ µg/mL a partir do HP-NCSB e $0,49 \pm 0,05$ µg/mL para o HP-SB, respectivamente). Os estudos de permeação em pele humana indicaram que a nanoencapsulação da silibinina aumenta sua retenção no estrato córneo, o que pode funcionar como depósito para liberação gradual deste ativo. Avaliando-se o potencial bioadesivo das formulações, constatou-se que o HP-NCSB destaca-se frente as demais formulações testadas. No estudo *in vivo*, os hidrogéis contendo as nanocápsulas de silibinina e óleo de romã foram capazes de atuar reduzindo expressivamente o edema de orelha e as células inflamatórias. No ensaio de biometria cutânea, para todos os parâmetros testados as formulações não alteraram as condições normais da pele dos voluntários. Portanto, baseado nos resultados obtidos, o desenvolvimento do hidrogel foi bem sucedido e que este atendeu a finalidade terapêutica proposta, podendo ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da dermatite de contato irritativa, utilizando o ativo de origem natural silibinina aliado a nanotecnologia, uma vez que foi possível demonstrar que o hidrogel contendo nanocápsulas de silibinina teve resultados satisfatórios frente ao hidrogel contendo silibinina não-nanoencapsulada, assim como foi possível demonstrar a contribuição do Pemulen® TR2 no desempenho das formulações.

Palavras-chave: Semissólidos. Nanopartículas. Silimarina. Inflamação.

ABSTRACT

NANOTECHNOLOGY-BASED HYDROGELS CONTAINING SILIBININ WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTION IN CROTON OIL MODEL

AUTHOR: Cristina Rigon

ADVISOR: Letícia Cruz

Currently, irritant contact dermatitis is the most prevalent dermatitis among the others and is triggered by the activation of innate immunity after skin contact with irritants. Silibinin (SB), a naturally occurring active, has beneficial activities for the cutaneous tissue, among which the anti-inflammatory action can be highlighted. Thus, in studies conducted in our research group, nanocapsule suspensions containing pomegranate oil as oily core and silibinin as active have been developed. Aiming at the skin application, this dissertation aimed to develop an innovative bioadhesive hydrogel for the delivery of this NC suspension and to verify its potential in the treatment of irritative contact dermatitis. The hydrogel was prepared from the polymer Pemulen® TR2, which has bioadhesive characteristics. The formulations were characterized in terms of SB content, pH, particle size and distribution, as well as spreadability and rheology, important characteristics mainly in the development of new products for dermal administration. For the studies of SB release from the hydrogels and cutaneous permeation of the active in human skin Franz cells were used. The bioadhesiveness test was performed using a texturometer and, in order to guarantee the safety of the formulations, the cutaneous biometry assay was performed, evaluating the parameters of erythema, pH, transepidermal loss of water and skin hydration. Also, considering the ability of SB to regulate inflammatory events, the viability of these hydrogels in the inflammation treatment was studied in an animal model induced by croton oil. The proposed formulations presented physico-chemical characteristics compatible with topical administration, maintaining the nanometric size after incorporation into the hydrogels (184 ± 26 nm), adequate pH range (6.70 ± 0.15), SB concentration close to concentration (0.99 ± 0.01 mg/g), as well as non-Newtonian pseudoplastic behavior. The *in vitro* release evidenced that the hydrogels containing the nanocapsules provided less silibinin retention in the dosage form for both media: phosphate buffer pH 5.5 plus ethanol and the buffer alone (4.73 ± 0.50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for HP-NCSB and 1.14 ± 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HP-SB and 2.25 ± 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from HP-NCSB and 0.49 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HP-SB, respectively). Permeation studies on human skin have indicated that the nanoencapsulation of silibinin increases its retention in the *stratum corneum*, which can act as a deposit for gradual release of this active. Evaluating the bioadhesive potential of the formulations, it was verified that the HP-NCSB stands out against the other formulations tested. In the *in vivo* study, the hydrogels containing the silibinin nanocapsules and pomegranate oil were able to act by expressively reducing ear edema and inflammatory cells. In the cutaneous biometry test, for all the parameters tested the formulations did not alter the normal skin conditions of the volunteers. Therefore, based on the results obtained, the hydrogel development was successful and the formulation has met the proposed therapeutic purpose, and may be a therapeutic alternative for the treatment of irritant contact dermatitis, using the natural source active silibinin allied to nanotechnology, since it was possible to demonstrate that the hydrogel containing silibinin nanocapsules had satisfactory results against the hydrogel containing non-nanoencapsulated silibinin, as well as it was possible to demonstrate the contribution of Pemulen® TR2 in the performance of the formulations.

Keywords: Semisolids. Nanoparticles. Silymarin. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das camadas que constituem a pele.....	13
Figura 2. Possíveis vias de penetração de fármacos através da pele.....	15
Figura 3. Representação esquemática de célula de <i>Franz</i>	15
Figura 4. Representação gráfica de NC (A e B) e nanoesferas (C).	21
Figura 5. Estrutura química do polímero Pemulen®	24
Figura 6. Flor de <i>Silybum marianum</i>	29
Figura 7. Estrutura química da SB	30
Figura 8. Aspecto macroscópico dos hidrogéis HP-NCB (A), HP-NCSB (B) e HP-SB (C).	43
Figura 9. Perfil de espalhabilidade das formulações HP-NCSB, HP-NCB e HP-SB.	46
Figura 10. Representação gráfica do viscograma referente às formulações (A) HP-NCSB, HP-NCB e (B) HP-SB.	47
Figura 11. Reograma referente às formulações (A) HP-NCSB, HP-NCB e (B) HP-SB.	48
Figura 12. Distribuição do tamanho de partículas presentes no meio receptor tampão fosfato pH 5,5 e etanol.	51
Figura 13. Distribuição do tamanho das partículas do meio receptor obtido após 8 h de experimento a partir do HP-NCSB em meio receptor de tampão fosfato pH 5,5 e etanol.	52
Figura 14. Distribuição do tamanho das partículas presentes no meio receptor obtido após 8 h de experimento a partir do HP-SB em meio receptor de tampão fosfato pH 5,5 e etanol.....	52
Figura 15. Quantidade de ativo liberada em função da área da membrana ao longo do tempo, utilizando como meio receptor tampão fosfato pH 5,5 e etanol.....	53
Figura 16. Quantidade de ativo liberada em função da área da membrana ao longo do tempo, utilizando como meio receptor tampão fosfato pH 5,5.....	53
Figura 17. Microscopia ótica dos HP-SB (A em aumento de 10x, mostrando várias cristalizações de SB e B e C em aumento de 45x, também mostrando as cristalizações de SB).	54
Figura 18. Distribuição da SB nas camadas cutâneas. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).	57
Figura 19. Efeito antiedematogênico dos hidrogéis.....	61
Figura 20. Efeito apresentado pelos hidrogéis na infiltração de celular.	61
Figura 21. Eritema cutâneo.	65
Figura 22. Perda transepidermal de água.	67
Figura 23. Hidratação cutânea.	67
Figura 24. pH cutâneo.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição quali e quantitativa dos hidrogéis.	35
Tabela 2. Características físico-químicas das formulações desenvolvidas (média ± desvio padrão, n=3).....	44
Tabela 3. Determinação do fator de espalhabilidade (média ± desvio padrão, n=3).	45
Tabela 4. Coeficiente de regressão (r) para as diferentes modelagens (média ± desvio padrão, n=3).....	49
Tabela 5. Índice de fluxo (<i>n</i>) e índice de consistência (<i>K</i>) dos hidrogéis (média ± desvio padrão, n=3).....	50
Tabela 6. Parâmetros bioadesivos dos hidrogéis.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 PELE: MORFOLOGIA, MECANISMOS DE PERMEAÇÃO / PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS	13
3.2 DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA	16
3.3 NANOCÁPSULAS E FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA: ASPECTOS GERAIS, APLICAÇÕES E AVALIAÇÕES	20
3.4 SILIBININA	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS	33
4.1.1 Matérias primas	33
4.1.2 Solventes	33
4.1.3 Equipamentos e outros materiais	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Preparo das suspensões de nanocápsulas	34
4.2.2 Preparação e caracterização dos hidrogéis	35
4.2.3 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de silibinina e óleo de romã	36
4.2.4 Avaliação da espalhabilidade	36
4.2.5 Avaliação reológica	37
4.2.6 Estudos de liberação <i>in vitro</i>	37
4.2.7 Estudos de permeação cutânea	38
4.2.8 Avaliação das propriedades bioadesivas dos hidrogéis	38
4.2.9 Atividade anti-inflamatória	39
4.2.10 Ensaios de biometria cutânea	41
4.2.11 Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SEMISSÓLIDOS	43
5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	45
5.3 AVALIAÇÃO REOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS	46
5.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SILIBININA A PARTIR DOS HIDROGÉIS	50
5.5 PERMEAÇÃO CUTÂNEA	55
5.6 BIOADESÃO	58
5.7 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON	60
5.8 BIOMETRIA CUTÂNEA	64
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE	85
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	86
APÊNDICE C – ESTUDO SENSORIAL PARA VOLUNTÁRIOS	88
APÊNDICE D – MANUSCRITO CIENTÍFICO	89

1 INTRODUÇÃO

Nanocápsulas (NC) têm sido estudadas como carreadores de substâncias ativas de origem sintética ou natural para uso cutâneo. Podem ser definidas como estruturas vesiculares, contendo geralmente um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica (MORA-HUETAS et al., 2010). Essas nanoestruturas são obtidas como suspensões líquidas, o que prejudica sua residência no tecido cutâneo. Para contornar esse aspecto, estudos recentes mostraram a incorporação de NC em hidrogéis (OURIQUE et al., 2011; KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2012; PEGORARO et al., 2017). Nanocarreadores podem contribuir para a modulação de processos como permeação/ penetração/ retenção dos ativos na pele, característica esta intimamente relacionada ao seu tamanho e estrutura (ALVES et al., 2007; MORA-HUETAS et al., 2010; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011; BALZUS et al., 2017).

O tecido cutâneo configura-se como a interface entre o ambiente externo e o ambiente interno do nosso organismo e é composto por uma estrutura complexa com múltiplos tipos celulares, atuando como uma eficiente barreira à penetração de moléculas exógenas. Em razão desta exposição, a pele é acometida por diferentes alterações e por isso é um alvo terapêutico frequente. Os distúrbios dermatológicos de origem inflamatória representam uma categoria bastante comum de doenças de pele, incluindo a dermatite de contato, atualmente uma das doenças ocupacionais mais relatadas na prática clínica (ZACK et al., 2018). A dermatite de contato é caracterizada por lesões eczematosas, causadas por agentes exógenos que podem ser sensibilizantes ou irritantes, subdividindo-se assim em dermatite de contato alérgica ou irritante, respectivamente. Dermatite de contato irritativa é a desordem inflamatória cutânea mais prevalente, desencadeada pela ativação da imunidade inata após o contato direto do irritante com a pele (MOTTA et al., 2011; KOSTNER et al., 2017).

O tratamento medicamentoso para a dermatite de contato geralmente está centrado no uso de corticosteroides tópicos (FERREIRA et al., 2014; CHÁVEZ et al., 2013). No entanto, apesar de possuírem notável importância no controle das inflamações, os corticosteroides apresentam efeitos adversos relevantes, relacionados a região do corpo envolvida, potência e tempo de administração, muitas vezes negligenciado (LÁZARO; GARCIA, 2010; CHÁVEZ et al., 2013).

Nesse sentido, ativos de origem natural representam uma opção interessante para contornar problemas já conhecidos dos corticosteroides. A planta *Silybum marianum* apresenta inúmeras potencialidades exploradas ao longo dos anos (CARINI et al., 1992; AGARWAL et al., 2003; KREN; WALTEROVÁ, 2005; MALLIKARJUNA et al., 2004). Entre todos os flavonóides isolados de seu extrato padronizado, a silibinina (SB) é considerada a principal, seja pela sua quantidade expressa ou em função de sua atividade biológica (MORAZZONI et al., 1992; POOJA et al., 2014). Nos processos inflamatórios a SB destaca-se por atuar em sua regulação, em particular, atuando na inibição do fator NF-KB, que está relacionado à expressão de genes ligados à inflamação (GAZAK et al., 2007; LIU et al., 2015).

Como apresenta limitada biodisponibilidade, a SB já foi incorporado em diferentes nanossistemas, como nanopartículas lipídicas sólidas (XU et al., 2013, SADIQ; RASSOL, 2014), lipossomas (HAN et al., 2018), nanopartículas de sílica porosa (CAO et al., 2013), nanossuspensão (ZHENG et al., 2011), nanopartículas poliméricas (GOHULKUMAR et al., 2014). Na literatura, estudos que desenvolveram nanossistemas com SB para incorporar formulações semissólidas visando o tratamento da dermatite são restritos. Mais recentemente, nanopartículas lipídicas sólidas contendo SB foram incorporadas a um hidrogel de Carbopol® com esse apelo terapêutico (SHROTRIYA et al., 2017).

Em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa, NC de óleo de romã contendo SB foram desenvolvidas e avaliadas em relação à sua citotoxicidade. Essas suspensões de NC foram espessadas com goma gelana para obtenção de um hidrogel para aplicação cutânea (MARCHIORI et al., 2017a; MARCHIORI et al., 2018b). Esse estudo elucidou que o hidrogel foi capaz de reduzir danos à pele de camundongos provocados pela radiação UVB, apresentando resultados que superaram as formulações contendo os ativos não-nanoencapsulados e também a sulfadiazina de prata, comumente utilizada para o tratamento de queimaduras.

Considerando as potencialidades da SB aliadas aos promissores resultados prévios obtidos por nosso grupode pesquisa, este estudo foi delineado para obter e avaliar hidrogéis contendo NC de óleo de romã contendo SB para tratamento de dermatite de contato irritativa. Para atingir este objetivo, o Pemulen® TR2 foi selecionado para o desenvolvimento dos hidrogéis a partir da incorporação das suspensões de NC. Pemulen® TR2 é um copolímero reticulado de ácido acrílico e metacrilatos de cadeia longa e, portanto, de alto peso molecular, que possui potencial

bioadesivo. Já foi utilizado em diversas formulações farmacêuticas e cosméticas. Tem baixo potencial irritante e, portanto, é compatível com a pele, pode ser utilizado em baixas concentrações, além da simplicidade de preparo dos hidrogéis a partir dele (FERREIRA, 2008; SHAHIN et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um hidrogel bioadesivo a base de suspensão de nanocápsulas contendo silibinina e avaliar, *in vivo*, o potencial da formulação em um modelo animal de dermatite de contato irritativa, bem como realizar estudo de permeação *in vitro* e biometria cutânea em pele humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

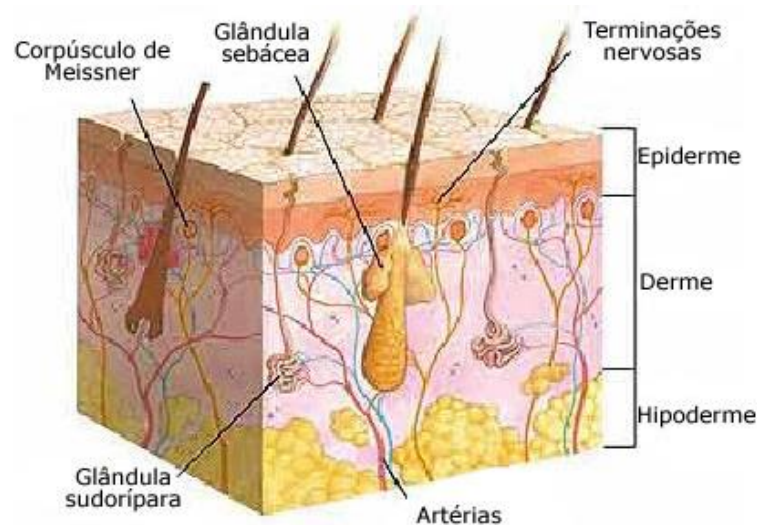
- Preparar hidrogel contendo nanocápsulas de silibinina;
- Avaliar o hidrogel quanto ao teor de silibinina, reologia, pH, espalhabilidade, tamanho e distribuição de partículas;
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* da silibinina a partir das nanocápsulas incorporadas no hidrogel;
- Realizar estudos de permeação cutânea da silibinina utilizando pele humana;
- Verificar a capacidade bioadesiva das formulações;
- Avaliar a performance do hidrogel desenvolvido em modelo animal de dermatite de contato irritativa;
- Investigar se o hidrogel promoverá mudanças em parâmetros biométricos da pele de voluntários saudáveis submetidos à aplicação do produto.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PELE: MORFOLOGIA, MECANISMOS DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS

A pele é composta basicamente por três camadas, a epiderme, a derme e logo abaixo há uma camada composta por tecido adiposo, a hipoderme (figura 1). Constitui o sistema de revestimento de todo nosso corpo com variadas espessuras, dependendo da região, atuando como uma eficiente barreira à penetração de moléculas exógenas, o que se deve principalmente ao estrato córneo (GODIN; TOUITOU, 2007; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

Figura 1. Representação das camadas que constituem a pele.



Fonte: <<http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2010/03/camadas-da-pele.jpg>>

A epiderme é a camada mais superficial, constituída principalmente pelos queratinócitos e é subdividida em epiderme basal, espinhosa, granulosa e córnea; a derme é composta pelas porções papilar e reticular, sendo caracterizada por ser um tecido rico em colágeno, resistente e que fornece nutrientes para a epiderme; já a hipoderme é composta por tecido adiposo contendo septos fibrosos ligados a derme (RIBEIRO, 2010; CUNHA; CUNHA; MACHADO, 2014). Por apresentar importante proteção mecânica do nosso corpo e também por haver menor permanência do ativo,

é muitas vezes um desafio desenvolver formulações para aplicação tópica, tornando-se relevante a elaboração de produtos capazes de aderir à pele, modular a penetração e permeação dos princípios ativos até as camadas de interesse, além de promover uma liberação controlada e sustentada dos fármacos incorporados. Conceitualmente, é importante diferenciar a terminologia referente aos processos de permeação e penetração cutânea. Diz-se que há penetração cutânea quando o fármaco ou ativo atravessa a barreira exercida pelo estrato córneo e que há permeação cutânea quando os mesmos migram de uma camada para outra (COLIPA, 1997; OMS, 2006).

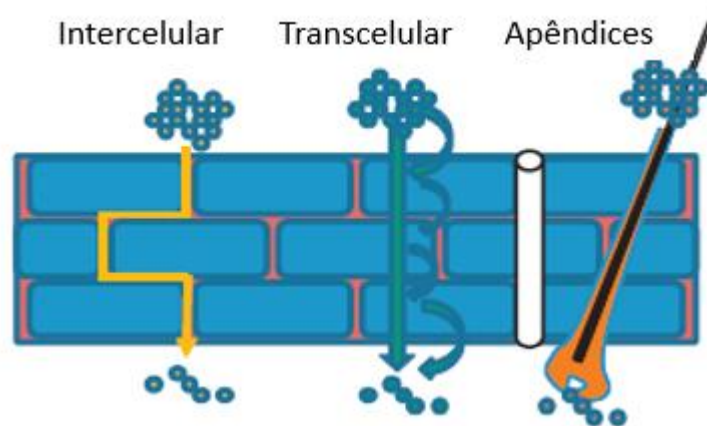
Ao administrar formas farmacêuticas cutâneas objetivando o tratamento de doenças de pele deve-se considerar que o fármaco presente na formulação necessita penetrar na pele e ali ficar retido tempo suficiente para exercer seu efeito terapêutico. Esses processos são afetados por diversos fatores que podem estar relacionados à formulação, às características físico-químicas do fármaco ou da pele e da área de aplicação (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2013). Após ser aplicado na pele, o fármaco pode entrar no tecido viável através de três meios: folículos pilosos e suas glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e estrato córneo contínuo (AULTON, 2016; DE SANTIS, 2008).

Existem duas vias pelas quais o fármaco pode ultrapassar o estrato córneo: transepidermal, a qual corresponde às rotas trans e intercelular, e através dos poros glandulares e foliculares (apêndices) (figura 2) (TROMMER; NEUBERT, 2006). Na via transcelular o fármaco atravessa as camadas lipídicas que compõem o estrato córneo e os queratinócitos, e por isso é considerada a via mais direta de permeação (TROMMER; NEUBERT, 2006; LANE, 2013). Já a via intercelular consiste na passagem das substâncias entre os corneócitos, considerada a principal rota de permeação. Embora seja a via que menos contribui para que o fármaco possa ser absorvido em função de ocupar pequena área da pele, os apêndices cutâneos são muito importantes tendo em vista as características particulares de cada molécula, como aquelas que se difundem lentamente ou as de alta massa molecular (SUHONEM; BORWSTRA; URTTI, 1999; LANE, 2013).

O processo de permeação/penetração de ativos nas camadas da pele, bem como os fatores envolvidos são frequentemente avaliados utilizando células de difusão de *Franz* (figura 3). Esta técnica, que é útil tanto no desenvolvimento farmacotécnico de formulações semissólidas como no controle de qualidade, é considerada bastante eficiente e pode ser realizada com o tecido em sua condição

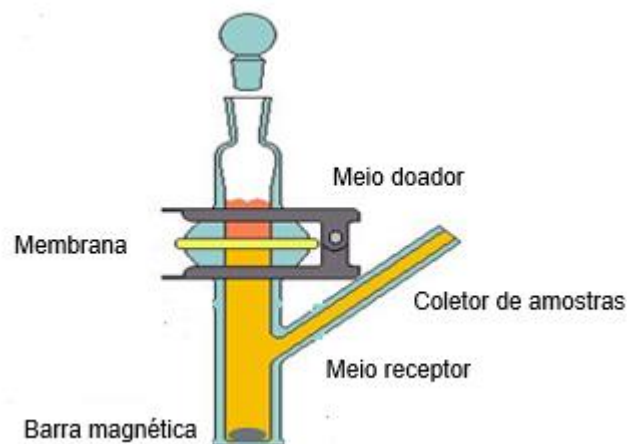
saudável ou danificada (SHAH et al., 1999; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016). Como membranas para a realização deste ensaio há na literatura um amplo espectro descrito. A pele humana *ex vivo* é considerada o padrão-ouro para este estudo, porém por sua obtenção ser mais restrita, visto que pode ser obtida através de descartes de cirurgias plásticas, cadáveres ou amputações, outros tecidos também são empregados. Assim, pode-se citar a pele de orelha de porco, camundongos sem pelo, culturas celulares bi e tridimensionais (epiderme humana reconstituída) (PRAÇA et al., 2017; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

Figura 2. Possíveis vias de penetração de fármacos através da pele.



Fonte: LANE, 2013 (Adaptado).

Figura 3. Representação esquemática de célula de Franz.



Fonte: <<http://www.spellglass.com.br>> (Adaptado).

Portanto, para identificar a distribuição dos ativos através das camadas cutâneas após a aplicação, realizam-se etapas de extração. A técnica de *tape stripping* é considerada bastante simples e consiste na remoção de camadas do estrato córneo através da sucessiva aplicação de fitas adesivas sobre a superfície da pele exercendo uma leve pressão, proporcionando a quantificação do ativo no estrato córneo (HERKENNE et al., 2007; PRAÇA et al., 2017). Para avaliar a concentração dos ativos nas camadas subsequentes, o tecido é submetido a temperatura de 60°C, por 45 s, afim de separar a epiderme da derme (WEISS-ANGELI et al., 2010). Além deste último, outros protocolos também são descritos na literatura, como por exemplo, a utilização da homogeneização do tecido com e sem estrato córneo, e ainda técnicas de imagem (HAGEN; BAKER, 2017; CAMPOS et al., 2016; PRAÇA et al., 2017).

Considerando-se a complexidade que envolve o processo de permeação/penetração cutânea de fármacos, muitas variáveis ou fatores são levados em consideração. Estes fatores podem ser biológicos, como a condição da pele, idade, espessura e a natureza do estrato córneo conforme a região, e também físico-químicos, incluindo a hidratação, temperatura, pH, tamanho molecular e a concentração do ativo farmacêutico na formulação (AULTON, 2016; HAGEN; BAKER, 2017). Ao administrarmos fármacos para serem absorvidos a partir da pele, pode-se ter como objetivo ação local ou sistêmica (MARTINS; VEIGA, 2002; SCHROETER et al., 2010). Os processos subsequentes à aplicação da formulação iniciam-se com a partição do fármaco para o estrato córneo. A partir daí as moléculas vão se difundindo, pois há um gradiente de concentração e passam para a epiderme, atingindo então a derme, irrigada linfática e vascularmente (LANE, 2013). Além dos fatores biológicos e físico-químicos já mencionados, há fatores relacionados ao veículo e como este interage com o fármaco, visto que quanto maior a interação entre eles, mais lentamente ocorrerá a liberação, retardando a absorção.

3.2 DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA

A pele, por estar em contato direto com o meio externo, tem por função primordial proteger o organismo frente a patógenos ou agressões diversas. Nela, de modo mais específico, na derme, ficam localizados linfócitos, macrófagos e mastócitos, células estas capazes de ativar-se e produzir sinais para recrutar outras células inflamatórias, como os neutrófilos. Assim, a derme além de irrigar

vascularmente as camadas cutâneas superiores, dá o suporte de nutrientes e tem papel importante na reação inflamatória (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000; DA SILVA, 2009). Na epiderme, encontram-se células de Langerhans (apresentam antígenos); queratinócitos ou ceratinócitos (sintetizam citocinas variadas a partir de estímulos como agentes químicos, luz UV, traumas e produtos bacterianos) e linfócitos T (LAZZARINI; FREITAS; OLIVEIRA, 2003).

A inflamação consiste em uma resposta do nosso organismo a agentes nocivos, na qual respostas vasculares, migração leucocitária e reações sistêmicas estão envolvidas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). No que tange as desordens inflamatórias cutâneas, existem diferentes tipos e etiologias, sendo que as dermatoses inflamatórias representam um número significativo da prática clínica diária (LAZZARINI; FREITAS; OLIVEIRA, 2003). Assim, destacam-se as dermatites eczematosas, caracterizadas por lesões avermelhadas, com secreções e crostas. Nesta categoria clínica encontramos a dermatite de contato, que acomete diferentes faixas etárias, inclusive crianças, sendo que, de todas as consultas dermatológicas, 4 a 7% são em sua decorrência. Ainda, a dermatite de contato pode ser classificada em dois tipos: uma causada por produtos químicos ou irritantes físicos, denominada de dermatite de contato irritativa (DCI) e a outra denominada dermatite de contato alérgica (DCA), sendo esta decorrente de hipersensibilidade a algum alérgeno específico (BÁNVÖLGYI et al., 2005; LEITE, 2011). Juntas, as dermatites de contato alérgicas ou irritativas configuram mais de 90% das doenças ocupacionais de pele (KOSTNER et al., 2017).

Na DCI, após os agentes irritantes lesarem a camada córnea da pele, há um aumento da permeabilidade e também produção de citocinas inflamatórias que estimulam outras células (ALCHORNE; ALCHORNE; SILVA, 2010). Desta forma, as células epidérmicas liberam mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos, apresentando uma maior infiltração de neutrófilos e menos vesículas que as demais dermatites, além de descamação com ou sem eritema (MOTTA et al, 2011, LEITE, 2011). Assim, após o dano à barreira epidérmica, diversas vias atuam em conjunto, as quais incluem: as alterações fisiopatológicas e dano celular epidérmico, liberação dos mediadores pró-inflamatórios e ativação da imunidade inata (HAN et al., 2014). Já na DCA, os antígenos que entram em contato com a epiderme e são captados pelas células de Langerhans para serem apresentados as células T CD4 e assim, quando re-apresentadas ao antígeno estas desencadeiam a reação inflamatória

ativando citocinas com propriedades inflamatórias, como é o caso das IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MOTTA et al., 2011).

Além da atuação dos queratinócitos na DCI, há também a participação das células de Langerhans que migram para a derme, porém o envolvimento destas células não está totalmente claro, visto que a resposta imune adaptativa não está envolvida na DCI, porém estudos sugerem que esta migração possa ser um mecanismo de escape para proteger estas células da morte celular pelos agentes irritantes. Células T infiltrantes também são encontradas na DCI e quando ativadas aumentam níveis de IL-2 e INF- γ , mas também seu papel não está completamente elucidado (LEE et al., 2013).

Esta dermatite eczematosa é subdividida em reação irritante subjetiva, DCI aguda, DCI aguda retardada, DCI crônica e dermatite do tipo queimadura química (LISBY; BAADSGAARD, 2010). A irritação subjetiva (ou sensorial) manifesta-se como uma sensação de queimação e não há sinais clínicos visíveis. Na DCI aguda e DCI aguda retardada os sintomas são bastante semelhantes entre si e são desencadeadas a partir do contato com potentes agentes irritantes, no entanto diferenciam-se através do tempo em que as reações tornam-se visíveis: na aguda tornam-se visíveis de minutos a horas após a exposição e na aguda retardada em torno de 8 a 24 horas após a exposição. A DCI crônica, também conhecida como cumulativa, é decorrente da exposição repetida a agentes irritantes, sendo caracterizada pelo eritema, ressecamento e hiperqueratose da pele, estando muito relacionada com atividades ocupacionais e por isto configura-se como o tipo de DCI mais prevalente. Por fim, a dermatite do tipo queimadura química caracteriza-se pela exposição a agentes irritantes, como substâncias ácidas e alcalinas, na qual a reação inflamatória se dá dentro de minutos, podendo levar a eritema, vesiculação e necrose tecidual (SLODOWNIK et al, 2008; SEYFARTH et al., 2009; LISBY; BAADSGAARD, 2010).

O tratamento da dermatite de contato depende da extensão e gravidade das lesões, sendo que o início precoce pode evitar complicações, como lesões secundárias, sequelas ou incapacidade para dar continuidade às atividades profissionais, observando-se que é fundamental o afastamento dos agentes irritantes ou sensibilizantes aliados à terapia medicamentosa (ALCHORNE; ALCHORNE; SILVA, 2010). Corticosteroides tópicos são amplamente utilizados e recomendados, estando dentre os principais fármacos empregados a dexametasona, triancinolona, betametasona e mometasona. Em casos mais graves, em que a área afetada

represente cerca de 20% da área corporal, recomenda-se a administração oral (FERREIRA et al., 2014).

Os corticosteroides são importantes agentes anti-inflamatórios, mas que possuem efeitos adversos no tecido cutâneo, que podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo da potência, área do corpo aplicada e duração do tratamento. Especificamente com relação à duração de tratamento com corticosteroides tópicos, estudos já evidenciaram que na área dermatológica é elevado o número de prescrições e que as orientações quanto a sua administração e tempo de uso são muitas vezes negligenciadas, principalmente quando se trata de corticosteroides de alta eficácia e alto risco, os quais devem ser utilizados em menor dosagem e tempo de tratamento (CHÁVEZ et al., 2013; LACHAPELLE et al., 2017). Estes efeitos adversos podem ser talangiectasias, atrofia epidérmica e dérmica, estrias, eritema, fragilidade cutânea, rosácea, glaucoma (quando aplicados na região ocular), hiper ou hipopigmentação, alterações imunológicas, dentre outros, lembrando-se que devido a possíveis absorções percutâneas outros efeitos adversos sistêmicos podem ocorrer (LÁZARO; GARCIA, 2010).

Vários modelos *in vitro* e *in vivo* são utilizados pelos pesquisadores para o estudo da DCI. A partir da década de 1980, quando a Comunidade Científica Europeia passa a fomentar ainda mais o uso de metodologias científicas alternativas ao uso de animais, técnicas *in vitro* para a distinção entre a potencialidade irritante ou não de uma substância química foram surgindo. Dentre estas técnicas, pode-se citar os ensaios de viabilidade celular em diferentes linhagens (fibroblastos e queratinócitos, por exemplo), epiderme humana reconstituída, ensaios em tecidos e também dosagem de biomarcadores envolvidos, como IL-1, IL-6, IL-8 e PGE₂ (GIBBS, 2009).

Com relação aos modelos *in vivo*, diversas substâncias irritantes são empregadas em trabalhos científicos que estudam a DCI, dentre os quais estão 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB), 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), óleo de cróton e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (HAN et al., 2007). O óleo de cróton é conhecido como um agente flogístico, que induz a infiltração de células inflamatórias e edema (NONNENMACHER, et al., 2017; KU et al., 2009). Este modelo animal vem sendo amplamente empregado para evidenciar o potencial anti-inflamatório de ativos sintéticos ou naturais, bem como é empregado para avaliar uma resposta inflamatória cutânea crônica, através de múltiplas aplicações, ou aguda, após aplicação tópica única (SARI et al., 2016; PIANA et al., 2016; DA SILVA, 2009). O modelo de edema

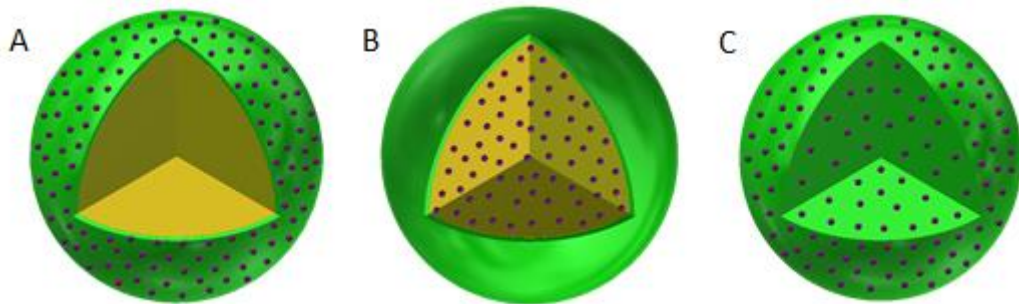
de orelha de camundongos induzido por esta substância irritante é utilizado em muitos estudos como modelo de DCI uma vez que o óleo de cróton é um irritante químico que pode causar inflamação tópica quando aplicado na pele do camundongo, induzindo edema e migração celular maciça de neutrófilos, que são características de DCI (DALLA POZZA, 2017; SILVA et al., 2013; ZHANG; TINKLE, 2000).

3.3 NANOCÁPSULAS E FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA: ASPECTOS GERAIS, APLICAÇÕES E AVALIAÇÕES

A nanotecnologia, no que diz respeito a sua aplicação na área farmacêutica, tem despertado o interesse de pesquisadores em função de algumas vantagens, principalmente relacionadas ao seu tamanho reduzido (DIMER et al., 2013). A literatura descreve o papel dos sistemas nanoestruturados como ferramentas para contornar limitações inerentes às substâncias ativas ou a via de administração, uma vez que são capazes, por exemplo, de promover liberação vetorizada e controlada de fármacos, melhorarem sua estabilidade físico-química ou contribuir para a solubilidade (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; HUANG et al., 2011; DAUDT et al., 2013). Os nanossistemas carreadores de fármacos apresentam diâmetro entre 10 e 1000 nm, dentre os quais podemos destacar os lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e micelas. Diferem entre si quanto à composição, métodos de preparação e características morfológicas (DIMER et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas subdividem-se em nanocápsulas (NC) e nanoesferas (figura 4). As nanoesferas consistem em sistemas matriciais, podendo o fármaco/ativo ficar retido ou adsorvido na matriz polimérica e não apresentam óleo em sua composição. Já as NC são constituídas por um invólucro polimérico em torno de um núcleo geralmente oleoso, sendo que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido ao polímero da parede (POHLMANN et al., 2013; DAUDT et al., 2013). As principais técnicas de preparação das nanopartículas poliméricas são: polimerização *in situ*, polimerização interfacial, deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação de solvente (DIMER et al., 2013). As NC, por serem os nanocarreadores abordados nesta dissertação, serão mais detalhadas a seguir.

Figura 4. Representação gráfica de nanopartículas poliméricas: A e B representam as NC e C as nanoesferas. A matriz polimérica das nanoestruturas é indicada pela cor verde, o núcleo oleoso das NC em amarelo e as substâncias ativas em roxo.



Fonte: Próprio autor.

NC vem sendo alvo de muitos estudos nos quais tem sido evidenciados resultados bastante promissores, tais como: aumento da estabilidade de fármacos que são instáveis frente a luz ou pH (OURIQUE et al., 2008; PEGORARO et al., 2017); liberação de fármacos para sítios específicos, como por exemplo aqueles atuantes na neuroproteção ou na terapia anticâncer (PIOTROWSKI et al., 2015; RADHAKRISHNAN et al., 2015); redução da irritação de tecidos devido ao efeito protetor conferido pelo invólucro polimérico, que pode ser biodegradável e biocompatível (REIS et al., 2006; FRANK et al., 2015). Recentemente em nosso grupo de pesquisa, o trabalho de Marchiori e colaboradores (2017) desenvolveu NC que continham como núcleo oleoso o óleo de romã (OR) e como ativo associado a SB. Nesse estudo foi possível observar que a nanoencapsulação da SB e OR foi capaz de proteger as células mononucleadas frente a danos ao DNA e que as NC tiveram melhor atividade sequestrante de radicais livres que os ativos não-nanoencapsulados. Além disto, este trabalho exemplifica a utilização de óleos vegetais como matéria prima para núcleos oleosos, o que vem sendo amplamente explorado, visto que contribuem não somente para a estrutura da NC como também através de suas valorosas atividades biológicas, como é o caso do OR. Este óleo apresenta potencial anti-inflamatório, antiproliferativo, anticâncer e regenerativo (BEKIR et al., 2013, SYED; AFAK; MUKHTAR, 2007; HORA et al., 2003).

Quanto à atuação de nanopartículas aplicadas cutaneamente, estas estruturas conseguem associar-se à superfície da pele devido a seu tamanho bastante reduzido,

material e rigidez. Assim, garantem íntimo contato com o estrato córneo promovendo transporte do ativo para as camadas mais profundas da pele (ALVES et al., 2007). Desta forma, estes sistemas podem alterar fenômenos de permeação, absorção e retenção de fármacos na pele e ainda diminuir a irritação do tecido ao serem aplicados (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011).

O desenvolvimento de formulações semissólidas contendo NC merece destaque uma vez que tais estruturas proporcionam vantagens interessantes quando comparadas com formulações convencionais para uso cutâneo. Além disso, a via cutânea, que apresenta vantagens como a realização do tratamento diretamente no local desejado, reduzindo efeitos sistêmicos, pode representar um obstáculo ao efeito terapêutico esperado em função de suas características estruturais (TING et al., 2004; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011).

Preparações para uso tópico visam, de modo geral, que o ativo atinja preferencialmente o sítio de ação desejado evitando a ação sistêmica (KREILGAARD, 2002). Desta forma, sistemas nanoestruturados podem atender a este objetivo e ao serem incorporados em géis de base aquosa propiciam uma aplicação facilitada e agradável sensação no tecido cutâneo. Além disto, podem reduzir a frequência de doses e apresentar efeito terapêutico até mesmo após a remoção da base dermatológica, uma vez que podem ficar depositadas no estrato córneo ou folículos pilosos (CHORILLI et al., 2006; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011; BEBER et al., 2016).

Encontra-se na literatura diferentes estudos sobre a aplicação de NC para uso cutâneo como, por exemplo, sua utilização em formulações fotoprotetoras (DAUDT et al., 2013; ANGELI, 2007), ou trabalhos como de Friedrich e colaboradores (2015) que avaliaram a penetração de NC de núcleo lipídico contendo resveratrol e curcumina na pele, no qual observou-se que estes nanossistemas tiveram resultado satisfatório em liberar os ativos. Alves e colaboradores (2007) avaliaram géis contendo NC, nanoesferas e nanoemulsões que tinham como fármaco associado a nimesulida e verificaram que o gel contendo NC foi o que apresentou maior penetração do fármaco através da pele em comparação com os géis contendo as outras nanoestruturas.

Ademais, é importante ressaltar que a utilização de suspensões coloidais líquidas sobre a pele dificulta a residência no local da administração e, por conseguinte, compromete a eficácia terapêutica. Em vista disso, a sua incorporação em formas farmacêuticas semissólidas é pertinente. Os hidrogéis são uma das

alternativas de formas farmacêuticas semissólidas mais exploradas pela literatura da área (PEGORARO et al., 2017; CONTRI et al., 2014).

Hidrogéis são formas farmacêuticas que podem ser aplicadas cutaneamente, caracterizados pela dispersão de polímeros com capacidade gelificante em água, dentre os quais pode-se utilizar polímeros bioadesivos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Hidrogéis bioadesivos oferecem vantagens em comparação a hidrogéis convencionais, pois ao aumentar a retenção no local de ação desejado, prolongam a permanência do ativo, proporcionando uma redução da frequência de administração e eficácia terapêutica tanto das camadas mais superficiais como as mais profundas da pele, uma vez que podem melhorar a absorção e o transporte de fármacos através das membranas celulares (PARENTE et al., 2015; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Os polímeros com características bioadesivas que vêm sendo empregados podem ser de origem natural ou sintética, podendo ser exemplificados pelos poliacrilatos, quitosana, celulose e seus respectivos derivados (SZUCS et al., 2008; MANSURI et al., 2016).

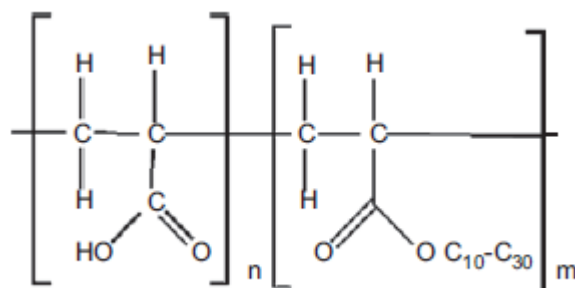
Polímeros bioadesivos podem ser definidos como grandes moléculas com elevada capacidade de retenção de água e de realizar ligações com hidrogênio, apresentando diferentes grupamentos funcionais (carboxilas, hidroxilas, aminas e amidas) (DIAS et al., 2007). Segundo Villanova; Oréfice; Cunha (2010) algumas propriedades intrínsecas desses polímeros podem ser elencadas como fundamentais, tais como peso molecular elevado, dispersibilidade aquosa, presença de grupos carboxílicos ou hidroxílicos, cadeia polimérica relativamente flexível e ainda caráter aniônico dos polímeros, embora alguns carregados positivamente também apresentem esta propriedade (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Como metodologias para avaliar a capacidade bioadesiva de polímeros ou as formas farmacêuticas derivadas dos mesmos existem aquelas baseadas em medidas reológicas, como o teste oscilatório, medindo assim a viscosidade e o comportamento elástico da formulação; técnicas que fazem uso de microscopia de força atômica (método de imagem), através da qual o equipamento constrói uma curva força-distância que é resultado da força exercida por uma ponta de prova, revestida com material adesivo, acoplada ao suporte do equipamento e a superfície em estudo. Além disto, há o método de escoamento de líquidos, que consiste em fixar a mucosa/tecido de interesse em um tubo cortado longitudinalmente e, com uma bomba propulsora, uma solução isotônica é vertida sobre a mucosa/tecido, sendo esta solução coletada

e quantificada por CLAE. Por fim, a técnica que tem sido mais empregada é o método baseado na medida da força de adesão, o qual conta com a utilização de um analisador de textura (ou texturômetro). Nele a membrana de interesse, que pode ser biológica ou então um disco de mucina, é fixada e, por um tempo pré-estabelecido, entra em contato com amostra. A força necessária para romper esta interação entre as duas interfaces é registrada por um *software* acoplado e a área sob a curva é calculada, fornecendo o trabalho de adesão (PEPPAS; BURI, 1985; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014; DE LIMA, 2015).

Pemulens[®] (TR1 e TR2) são copolímeros do ácido acrílico e metacrilatos de cadeia longa (acrilato/C10-C30), de alto peso molecular, capazes de conferir bioadesão (figura 5) (SZUCS et al., 2008, FERREIRA, 2008). Além de serem formadores de gel, os Pemulens[®] apresentam estabilidade, facilidade de preparação, compatibilidade com a pele e são pouco irritantes, dado o fato de que para o preparo das formulações menos de 1% deste polímero é necessário. O Pemulen[®] TR2 é um polímero empregado no preparo tanto de cosméticos, por exemplo, cremes de cuidado para a pele, como também com fins farmacêuticos, possui maior capacidade emulsificante de óleos, podendo produzir formulações com menor viscosidade (LUBRIZOL, 2007, SHAHIN et al., 2011; FERREIRA, 2008).

Figura 5. Estrutura química do polímero Pemulen[®]



Fonte: SHAHIN et al., 2011

Exemplos de aplicações do polímero Pemulen[®] TR2, e também TR1, são encontradas na literatura, porém predominantemente abordando sua utilização em mucosas (SZUCS et al., 2008; PERIOLI et al., 2008, DIAS et al., 2007, LIMA et al., 2017). No estudo de Dias e colaboradores (2007) foram comparados diferentes

polímeros com propriedades bioadesivas para serem empregados em comprimidos de administração bucal. Observou-se que os comprimidos contendo o Pemulen® TR2 tiveram elevado desempenho bioadesivo. Contudo, os trabalhos como os de Savic e colaboradores (2002) e Qiu e colaboradores (1998) desenvolveram formas farmacêuticas de uso tópico contendo Pemulen® TR2: no primeiro estudo empregando-o como estabilizante de emulsões e no segundo como veículo para o repelente de insetos DEET. No trabalho de Sahim e colaboradores (2011), foram otimizados géis de Pemulen® TR1 e TR2 para a aplicação cutânea do clotrimazol, obtendo formulações reologicamente adequadas e que promoveram uma liberação do fármaco mais rápida que da pomada comercial utilizada como comparativo. Diante do exposto, é importante enfatizar que não há na literatura científica trabalhos utilizando o Pemulen® TR2 como polímero formador de gel para veicular nanoestruturas, assim como não foram encontrados trabalhos com o intuito de desenvolver hidrogéis para aplicação cutânea utilizando o Pemulen® TR2 que explorassem seu potencial bioadesivo.

Geralmente as avaliações realizadas para caracterizar sistemas semissólidos envolvem as técnicas físico-químicas (pH, teor, diâmetro médio e distribuição de tamanho das nanopartículas), espalhabilidade, caracterização reológica e estudos de liberação e permeação *in vitro*. Em relação aos métodos envolvendo a caracterização físico-química cabe mencionar que cada componente de uma formulação, ativo ou não, pode alterar características importantes e promover fenômenos de instabilidade, notando-se, portanto, a relevância da avaliação físico-química das formas farmacêuticas desenvolvidas. Com relação ao pH, sua determinação é de suma importância, pois é capaz de explicar fenômenos de instabilidade ao longo do tempo. Tais fenômenos incluem, por exemplo, a degradação de substâncias presentes na formulação, e ainda se está de acordo com a via de administração desejada (SCHAFFAZICK et al., 2003). A avaliação do tamanho médio das nanopartículas, bem como a distribuição do seu tamanho na formulação também são propriedades importantes em termos de aplicação cutânea, considerando-se que o tamanho influencia na deposição e permeação dos ativos na pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). A espalhabilidade pode ser entendida como a expansão de um semissólido sobre determinada superfície, neste caso o tecido cutâneo, em um certo período de tempo (BORGHETTI; KNORST, 2006). A garantia de eficácia de um tratamento por via tópica depende muito da espalhabilidade do produto, pois é

fundamental que a dose correta seja aplicada para que então os efeitos terapêuticos sejam alcançados e isto só é possível se o paciente tem facilidade em aplicar a formulação de modo homogêneo no local desejado. Assim sendo, a determinação da espalhabilidade é de suma importância tanto para a aceitabilidade do consumidor quanto para a eficácia clínica como, por exemplo, de fotoprotetores, e ainda auxiliar na escolha de matérias-primas para a formulação, na verificação da estabilidade das mesmas ao longo do tempo ou somente com caráter comparativo (GARG et al., 2002; MILESI; GUTERRES, 2002; RIGO et al., 2012).

A caracterização reológica de semissólidos é de suma importância no desenvolvimento de novos produtos para uso cutâneo. A partir desta avaliação pode-se delinear e otimizar processos de fabricação e acondicionamento, podendo desta forma prever o desempenho da formulação semissólida e garantir sua estabilidade e eficácia (CORRÊA et al., 2005; BORGHETTI; KNORST, 2006; AULTON, 2016). Reologia compreende a avaliação do comportamento ou da resposta dos materiais em termos de fluidez, observando-se, portanto as deformações dos líquidos, sólidos ou semissólidos, classificando-os a partir disto como fluidos newtonianos e não-newtonianos (ALVES, 2006). Neste sentido, caracterizar as formulações reologicamente permite verificar a influência nas propriedades de fluxo causadas pela incorporação ou não de determinada matéria-prima ou algum ativo, bem como a incorporação de sistemas nanoestruturados, avaliando assim a capacidade de cada sistema como um veículo para administração cutânea (FERREIRA, 2008; BRUSCHI, 2010). O comportamento de fluxo dos sistemas não-newtonianos é dividido em dependente e independente do tempo: os materiais dependentes do tempo são caracterizados por apresentarem uma curva de histerese, característica esta pertencente aos fluidos tixotrópicos ou reopéticos. Já os sistemas que tem sua viscosidade dependente apenas da tensão de cisalhamento aplicada incluem os materiais plásticos, pseudoplásticos e dilatantes (AULTON, 2016).

O fluxo plástico ou de Bingham é aquele em que é necessária uma tensão de cisalhamento inicial para então fluir e, após atingir uma tensão de cisalhamento limite, passa a apresentar um comportamento linear ou newtoniano (FERREIRA, 2008; ALVES, 2006). O fluxo pseudoplástico caracteriza aqueles materiais que começam a fluir assim que uma tensão é aplicada, ou seja, não possuem um ponto de cedência, e a inclinação da curva vai diminuindo ao aumentar a velocidade de cisalhamento (AULTON, 2016). No fluxo dilatante a viscosidade aumenta a medida que aumenta a

velocidade de cisalhamento, estes materiais aumentam de volume enquanto aplica-se o cisalhamento, sendo considerado um fenômeno mais raro que os outros tipos de fluxo não-newtoniano e é encontrado em dispersões que apresentam alta concentração de partículas defloculadas, podendo causar sérios problemas no processo de produção (AULTON, 2016).

Considerando que o fluxo não-newtoniano é amplamente encontrado nas preparações farmacêuticas como sistemas coloidais ou dispersos, abrangendo emulsões, suspensões e géis, são melhor descritos e facilitam a compreensão através de equações matemáticas que correspondem a modelos que relacionam a dependência da tensão de cisalhamento aplicada com a taxa de deformação (ALVES, 2006; SHIROMA, 2012; KIM et al., 2003; AULTON, 2016). Os mais comumente utilizados são:

- *Fluxo de Bingham*: indica aqueles materiais que necessitam de uma tensão de cisalhamento inicial (valor de cedência) para começar a fluir, e a partir de então tem comportamento de um fluido newtoniano. São descritos conforme a equação (1) (AULTON, 2016; ALVES, 2006).

- *Modelo de Casson*: neste modelo, descrito pela equação (2), os fluidos também necessitam de uma tensão inicial para fluir, sendo comumente relacionados com alimentos líquidos ou o sangue (SHIROMA, 2012).

- *Modelo de Ostwald de Waele*: a partir deste modelo (equação (3)) podemos encontrar os valores de K e de n, os quais são parâmetros importantes na caracterização das formulações, e que podem ser obtidos através do gráfico ao plotar o $\log \sigma$ versus $\log \dot{\gamma}$ (ALVES, 2006).

- *Modelo de Hershel-Bulkley* (equação (4)): difere do modelo anterior por apresentar um valor de cedência, mas após atingir este valor segue o modelo de Ostwald. Um exemplo deste tipo de comportamento é a pasta de dente (ALVES, 2006; SHIROMA, 2012).

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\sigma^{0,5} = \sigma_0^{0,5} + \eta^{0,5} \dot{\gamma}^{0,5} \quad (2)$$

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

$$\sigma = \sigma_0 + K \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

Onde: σ é a tensão de cisalhamento, γ taxa de cisalhamento, n é o índice de plasticidade e K é o coeficiente de consistência, σ_0 é o valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite e η é a viscosidade.

Modelos *in vitro* para a avaliação da liberação e absorção de fármacos através da pele vem sendo utilizados em substituição aos testes *in vivo*, os quais apresentam maior dificuldade de avaliar a permeação de ativos na pele e também em função da possibilidade de maior controle e de mais fácil reprodutibilidade nas metodologias *in vitro* (MEIRA, 2010; TANOJO et al., 1997). Assim, configuram uma importante ferramenta para determinar os mecanismos e processos de liberação, retenção e absorção percutânea dos ativos para que então apresentem a atividade terapêutica desejada a partir da formulação em estudo. A técnica *in vitro* desenvolvida por Franz (1975) utilizando células de difusão é amplamente difundida. Consiste em um compartimento doador e outro receptor, separados entre si por uma membrana de escolha. Estas membranas podem ser sintéticas, como preconizado pelo Food and Drug Administration (FDA) para estudos de liberação a partir de semissólidos ou biológicas de origem animal ou humana (FRANZ, 1975; MEIRA, 2010; TANOJO et al., 1997). A solução receptora deve consistir, preferencialmente, de um fluido com características fisiológicas e que não prejudique a integridade cutânea (OECD, 2004). A técnica de permeação *in vitro*, que também se dá utilizando células de Franz, já foi abordada no item 3.2.2.

Concluindo as metodologias utilizadas para a caracterização e avaliação de produtos de uso cutâneo, é fundamental abordar a biometria cutânea, uma metodologia não invasiva, composta por variadas técnicas que avaliam parâmetros físico-químicos diferentes. As avaliações dos parâmetros biométricos cutâneos são úteis tanto para a área dermatológica, como também cosmética e medicina estética, isto porque anteriormente a estas técnicas não invasivas, as avaliações dermatológicas, por exemplo, eram subjetivas, baseadas em observações clínicas, o que a partir destas técnicas passou a se dar de modo quantitativo, podendo assim mensurar os efeitos dos produtos sobre a pele. Assim, parâmetros importantes para a manutenção das condições fisiológicas da pele como conteúdo de água do estrato córneo (grau de hidratação), pH cutâneo, perda transepidermal de água podem ser estudados, bem como a avaliação do eritema, o qual é correlacionado com a irritação da pele e por isso muitas vezes empregado com a finalidade de averiguar a segurança de produtos para aplicação cutânea. Respectivamente, as sondas/equipamentos que

podem ser empregados nestas medidas sobre a pele podem ser: Corneometer[®], Skin-pH-meter[®], Tewameter[®] e Mexameter[®] (CLARYS et al., 2000; WISSING; MÜLLER et al., 2003; ROSADO et al., 2009; BLAAK et al., 2017).

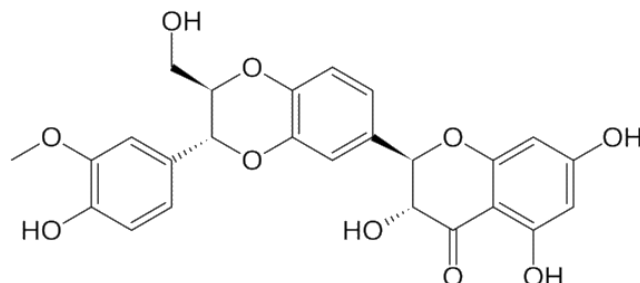
3.4 SILIBININA

A planta *Silybum marianum* é utilizada há muitos anos como planta medicinal, conhecida popularmente como Cardo de leite e/ou Cardo mariano (figura 6). Tem como extrato seco padronizado a silimarina (SM), a qual é composta por um complexo de flavoglicanos (70 a 80%) dentre os quais está a SB (KREEN; WALTEROVÁ, 2005). A SM é empregada em diferentes regiões do mundo, como Europa, Ásia e Estados Unidos no tratamento de problemas hepáticos (SINGH; AGARWAL, 2005). O principal, por ser o mais abundante e biologicamente ativo, componente da SM é a SB (figura 7), um flavonoide que apresenta dificuldade em solubilizar-se em água e possui peso molecular de 482,44 g/mol (GREEN; KALISCH, 2013; VOINOVICH et al., 2009; CAO et al., 2013). Cabe comentar que à SB, por ser o componente majoritário e que apresenta os efeitos biológicos mais importantes do extrato, são atribuídos grande parte dos efeitos da SM (FEDERICO, DALLIO, LOGUERCIO, 2017, LINO, 2012, AHMAD et al., 2015).

Figura 6. Flor de *Silybum marianum*



Figura 7. Estrutura química da SB



Fonte: KREEN; WALTEROVÁ, 2005.

A SB apresenta inúmeras potencialidades para diferentes desordens no organismo humano, uma vez que flavonoides são capazes de atuar em processos inflamatórios, neoplasias, hepatopatias, entre outros (DI CARLO et al., 1999). No estudo de Kreen e Walterová (2005) é relatada sua capacidade de atuar na terapêutica de doenças renais e pulmonares e também na cardio e neuroproteção, o que está ligado diretamente aos efeitos em nível molecular e celular da SB. Sua atuação como agente antitumoral já está bem relatada na literatura e tal atribuição é relacionada não somente com sua capacidade antioxidante e conseqüentemente citoprotetora, mas também de atuar em receptores celulares envolvidos na progressão de células cancerosas nos mais diferentes órgãos modulando processos mitóticos, sinalização e regulação do ciclo celular (GAZAK; WALTEROVÁ; KREN, 2007).

Quanto à atuação em processos inflamatórios, a SM assim como a SB são capazes de atuar na sua regulação, principalmente por conseguirem agir na inibição do NF- κ B, o qual está relacionado com a expressão de muitos genes que atuam na inflamação (GAZAK, WALTEROVÁ, KREEN, 2007; LIU et al., 2015). Estudos envolvendo a SB e SM puderam evidenciar que tais ativos tem potencial anti-inflamatório na via respiratória, o que poderia ser uma alternativa para o tratamento da asma, da inflamação alérgica, das infecções de recém-nascidos em decorrência do nascimento prematuro, e também no tratamento dos danos cutâneos provocados pela radiação UVB (CHOI et al., 2012; KIM et al., 2013; LIM et al., 2014; MARCHIORI et al., 2017).

Com relação ao uso da SM ou SB associados a nanossistemas, pode-se encontrar em nanopartículas lipídicas sólidas (XU et al., 2013; PRAPHANWITTAYA; CHOMTO; PHAECHAMUD, 2013; SADIQ; RASSOL, 2014), lipossomas (EL-SAMALIGY; AFIFI; MAHMOUD, 2006), nanopartículas de sílica porosa (CAO et al., 2013), nanossuspensão (ZHENG et al., 2011) e nanopartículas poliméricas (DAS et al., 2011; GOHULKUMAR et al., 2014; MARCHIORI et al., 2017).

Outros aspecto importante a ser descrito quanto à utilização da SM e SB em pesquisas científicas está focado no uso de tais ativos para o tratamento das mais diversas doenças cutâneas. Como exemplos podem ser citados o tratamento de rosácea (BERARDESCA et al., 2008), melanoma (VAID et al., 2015), cicatrizante (SHARIFI et al., 2012) e câncer de pele não-melanômico (RIGBY et al., 2016). No entanto, muitos dos trabalhos existentes voltados para o tratamento de doenças de pele não exploram o desenvolvimento de formas farmacêuticas, como cremes, géis e pomadas para viabilizar a aplicação da SB.

Neste sentido, podemos mencionar como exemplos os trabalhos de Mady e colaboradores (2016), em que o objetivo principal foi desenvolver um gel de Pluronic® e lecitina contendo SM para o tratamento de dermatite atópica através de um estudo clínico; e o trabalho de Khan; Thube; Rab (2014) no qual desenvolveram um gel de Carbopol® contendo SM para o tratamento da psoríase. Em nosso grupo de pesquisa, no estudo de Marchiori e colaboradores (2017), propôs-se uma formulação de uso tópico veiculando a SB nanoencapsulada em um hidrogel a partir do polímero natural goma gelana, no qual se verificou que as formulações desenvolvidas foram capazes de tratar os danos cutâneos em decorrência da exposição à radiação UVB e ainda, prolongar a atividade terapêutica, comparando-se com as formulações contendo os ativos livres. Ademais, Shrotriya; Vidhate, Shukla (2017) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo SB e incorporaram em géis de Carbopol® 940. Estas formulações apresentaram resultados compatíveis com a aplicação tópica e reduziram sinais de inflamação em comparação com o gel contendo a SB não-nanoencapsulada. Recentemente, Iqbal e colaboradores (2018) desenvolveram um carreador lipídico nanoestruturado veiculando a SM, para posteriormente incorporar em gel de Carbopol® 934, objetivando estudar o perfil de permeação cutânea do ativo em pele de ratos e estudo de irritação cutânea em camundongos.

Desta forma, é relevante propor o desenvolvimento de uma alternativa inovadora de formulação semissólida contendo SB como agente terapêutico para a

dermatite de contato, buscando não somente contornar limitações deste ativo como a irritação cutânea e a dificuldade de solubilizar-se em água, mas também observando que o tratamento adotado para a dermatite de contato está baseado na utilização de corticosteroides, que podem ter sua utilização restringida em função dos efeitos adversos que apresentam (SINGH et al., 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2016; FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias primas

- Silibinina: Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América;
- Óleo de romã: Florian, Brasil
- Etilcelulose (Ethocel[®] 10 Premium): Colorcon, Estados Unidos da América;
- Monooleato de sorbitano (Span[®] 80): Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América;
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80): Delaware, Brasil;
- Pemulen[®] TR2: Noveon, Estados Unidos da América;
- Trietanolamina: Vetec, Brasil;
- Imidazolinidil ureia (Germall[®]): Pharma Nostra, Brasil;
- Carbopol[®] Ultrez: Delaware, Brasil;
- Hematoxilina-eosina: Merck, Alemanha;
- Parafina: Merck, Alemanha;
- Óleo de cróton: Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América;
- Isofurano (Forane[®]): Baxter, Brasil;
- Cetamina (Dopalen[®]): Ceva, Brasil;
- Xilazina (Anasedan[®]): Ceva, Brasil;
- Dexametasona: Teuto, Brasil.

4.1.2 Solventes

- Metanol grau HPLC: Dinâmica, Brasil;
- Acetona P. A.: Dinâmica, Brasil;
- Etanol: Dinâmica, Brasil e Vetec, Brasil (*in vivo*);
- Dimetilsulfóxido: Vetec, Brasil e Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América (*in vivo*);
- Acetonitrila grau HPLC: LiChrosolv, Alemanha;
- Formaldeído: Vetec, Brasil;
- Ácido acético: Vetec, Brasil.

4.1.3 Equipamentos e outros materiais

- Balança analítica: Shimadzu, Japão;
- Agitador magnético: Tecnal, Brasil;
- Evaporador rotatório Buchi R-3: Buchi, Brasil;
- Potenciômetro - modelo pH 21, Hanna, Brasil;
- Zetasizer Nanoseries: Malvern Instruments, Reino Unido;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – modelo LC-10 A (Bomba - LC 20AT, Controlador- CBM 20A, Detector UV/VIS - SPD M20A): Shimadzu, Japão;
- Válvula de injeção - manual, Rheodyne;
- Pré-coluna SecurityGuard C₁₈ 4 x 3,0 mm;
- Coluna Kinetex C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å);
- Impressora multifuncional: Scanner HP Officejet 4500 Desktop, Brasil;
- Vórtex - modelo AP-56: Phoenix Lufarco, Brasil;
- Analisador de textura TA.XTplus: Stable Microsystem, Reino Unido;
- Viscosímetro rotacional: Brookfield® modelo DV-I prime, Brasil;
- Células de difusão vertical de Franz: Vidrotec, Brasil;
- Sondas Mexameter®, Skin-pH-Meter®, Corneometer® e Tewameter: Courage-Khazaka, Alemanha;
- Micrômetro digital: Digimess, Brasil;
- Microscópio óptico: Ernst LeitzGmbHWetzlar, Alemanha;
- Centrífuga: Solab, Brasil.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de NC foram preparadas em triplicata pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (MARCHIORI et al., 2017). A fase orgânica contendo SB (0,01 g), OR (0,3 g), tensoativo Span® 80 (0,077 g), etilcelulose (0,1 g) e acetona (50 mL), foi mantida sob agitação magnética por 1 h a temperatura de 40°C e a fase aquosa contendo o tensoativo Tween® 80 (0,077 g) e água destilada (50 mL), também foi mantida sob agitação magnética. A fase orgânica foi vertida lentamente sob a fase aquosa e a agitação magnética mantida por durante 10 min. O

solvente orgânico foi eliminado através da rotaevaporação e o volume final das suspensões de NC foi concentrado até 10 mL.

4.2.2 Preparação dos hidrogéis

A tabela 1 apresenta a composição quali-quantitativa do hidrogéis desenvolvidos nesse estudo. As formulações foram preparadas em triplicata utilizando gral e pistilo. O Pemulen® TR2 foi empregado como polímero formador de gel na concentração de 0,7%. As suspensões de NC de SB, na concentração de 1 mg/mL foram incorporadas lentamente, a frio, ao polímero, após este ser triturado em gral. Após a dispersão, procedeu-se a neutralização com trietanolamina e, por fim, adicionou-se 0,6% de Imidazolidinil ureia (Germall®) como conservante. Os hidrogéis contendo SB nanoencapsulada foram denominados de HP-NCSB e os hidrogéis contendo a suspensão de NC omitindo-se a SB foram denominados de HP-NCB. Os hidrogéis de SB não-nanoencapsulada (HP-SB) foram preparados solubilizando a SB em dimetilsulfóxido (DMSO) em um béquer para então serem incorporados na dispersão do polímero em água, finalizando com a neutralização e adição do conservante.

Para o ensaio *in vivo*, outros três hidrogéis de Pemulen® TR2 foram desenvolvidos, apenas com caráter comparativo para a execução desta avaliação. Assim, hidrogéis contendo apenas o óleo de romã (HP-OR), hidrogéis contendo o óleo de romã e SB (HP-SBOR) e o veículo foram preparados da mesma forma que os demais. Já para o estudo de bioadesão, também somente com fins comparativos, um hidrogel de Carbopol® Ultrez, na concentração de 0,5% foi preparado, utilizando as mesmas concentrações de trietanolamina e imidazolidinil ureia utilizadas para o preparo dos demais hidrogéis

Tabela 1. Composição quali e quantitativa dos hidrogéis.

Componente	HP-NCSB	HP-NCB	HP-SB
Suspensão de NC (mL)	10	10	-
DMSO (mL)	-	-	0,66
Água destilada (mL)	-	-	q.s.p. 10
Pemulen® TR2 (g)	0,07	0,07	0,07

Trietanolamina (μL)	100	100	100
Imidazolidinil ureia (μL)	200	200	200

4.2.3 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de silibinina e óleo de romã

As formulações obtidas foram caracterizadas quanto ao pH, teor e distribuição do tamanho das NC incorporadas no hidrogel ($n=3$). O pH da formulação foi verificado através de uma dispersão a 10% do gel em água destilada utilizando potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

O teor de SB foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sob as seguintes condições: fase móvel água pH 3,5:acetonitrila (60:40v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de 288 nm. Para realizar o doseamento pesou-se 0,25 g do gel em béquer e adicionou-se 20 mL de metanol. As amostras foram submetidas a ultrassom por 20 min e posteriormente a agitação magnética por 10 min. Após, aferiu-se os balões volumétricos de 25 mL, centrifugou-se o conteúdo do balão volumétrico por 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi filtrado por membrana de 0,45 μm de porosidade e analisado por CLAE. O software *Class VP* foi utilizado para a realização da integração dos picos.

O diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons. Para esta análise solubilizou-se os hidrogéis em água ultrapura através de agitação magnética (1:500). Após as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e posteriormente em membrana de porosidade de 0,45 μm .

4.2.4 Avaliação da espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada em triplicata, através do método das placas paralelas descrito por Borghetti e Knorst (2006) e modificado por Rigo e colaboradores (2012). Nessa técnica, a amostra foi cuidadosamente colocada no orifício central, apresentando 1,2 cm de diâmetro, de uma placa de vidro, removida lentamente. Sobre a amostra, em intervalos de 1 min, foram sendo colocadas placas de vidro (10 x 10 cm) com massas conhecidas. A cada nova placa, utilizando um *scanner*, a imagem da formulação era registrada. Para verificar a área expandida da formulação a cada

placa aplicada, utilizou-se o programa ImageJ (*Version 1.49q, National Institutes of Health, EUA*). O fator de espalhabilidade (FE), em mm²/g, foi determinado utilizando a equação (5), onde A= área máxima espalhada e P= peso total aplicado.

$$FE= A \text{ (mm}^2\text{)} / P \text{ (g)} \quad (5)$$

4.2.5 Avaliação reológica

A avaliação reológica foi realizada utilizando um viscosímetro rotacional. Para esta análise foram necessários 30 g de cada gel. O *spindle* de escolha foi o RV06, nas seguintes velocidades de cisalhamento: para as formulações HP-NCSB e HP-NCB as velocidades foram 1, 5, 10, 20, 50 e 100 rpm e para as formulações HP-SB as velocidades foram 10, 12, 20, 30, 50 e 100 rpm. Para avaliar qual modelo reológico melhor descreveu o comportamento dos hidrogéis, utilizou-se as equações 1, 2, 3 e 4.

4.2.6 Estudos de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado utilizando células de difusão vertical do tipo *Franz*, empregando uma membrana de ésteres mistos de celulose (nitrato e acetato de celulose), apresentando porosidade de corte de 0,22 µm.

O estudo foi realizado empregando-se dois tipos de soluções receptoras (ou meios de liberação), um atendendo a condição *sink* e outro mais similar às condições fisiológicas, tampão fosfato pH 5,5:etanol (70:30) e tampão fosfato pH 5,5, respectivamente. O meio foi mantido a temperatura de 32 ± 0,5 °C, sendo constantemente agitado com uma barra magnética. Colocou-se 0,5 g (dose infinita) de HP-NCSB e HP-SB na parte superior da membrana e nos intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 h foram coletados 0,5 mL da solução receptora, a qual foi repostada imediatamente. As alíquotas coletadas das células que continham HP-NCSB foram diluídas com metanol (200 µL de metanol e 100 µL da amostra) e foram analisadas por CLAE conforme condições descritas no item 4.2.3.

4.2.7 Estudos de permeação cutânea

O estudo de permeação cutânea foi conduzido utilizando células de difusão tipo *Franz*, empregando pele humana como membrana, proveniente de abdominoplastia de pacientes do sexo feminino, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE: 552200016.3.0000.5346). Recortes circulares de pele foram cuidadosamente posicionados nas células, de modo que a derme ficasse em contato a solução receptora, composta por tampão fosfato pH 5,5, e o estrato córneo voltado para a superfície da célula. Este meio foi mantido a $32 \pm 0,5$ °C, por 8 h, sob agitação constante utilizando uma barra magnética.

Ao final do tempo experimental, as células foram desmontadas e o restante da formulação sobre a pele foi removido completamente utilizando uma espátula. Em seguida, para determinar a quantidade de SB no estrato córneo, a técnica de *tape stripping* foi utilizada, na qual, utilizando uma fita adesiva e realizando uma pressão uniforme por um único avaliador, camadas do estrato córneo foram removidas, através de 18 *tapes*. A pele foi pesada antes e depois da remoção do estrato córneo e as fitas colocadas em tubo de ensaio contendo 4 mL do solvente extrator metanol. O tubo então foi submetido à agitação por 2 min no vórtex e por 15 min no ultrassom. Após a filtração, a solução foi doseada por CLAE.

Após, para a separação da epiderme da derme, a pele utilizada foi imersa por 45 segundos em água, a 60 °C. Utilizando uma espátula, removeu-se a epiderme que em seguida foi inserida em tubo de ensaio contendo 1 mL do solvente extrator. Por fim, a derme foi cortada em pequenos pedaços e colocada em um tubo de ensaio com 2 mL do solvente. Em seguida, realizou-se agitação em vórtex e ultrassom. A solução também foi filtrada e analisada por CLAE, assim como o meio receptor.

4.2.8 Avaliação das propriedades bioadesivas dos hidrogéis

Os hidrogéis HP-NCSB e HP-SB desenvolvidos foram avaliados quanto a sua bioadesividade cutânea utilizando um analisador de textura (texturômetro). Os hidrogéis foram colocados em um probe acoplado a um braço móvel e o tecido biológico (pele de orelha de porco) foi adicionado ao suporte fixo. A pele e os hidrogéis entraram em contato, a uma força de 5 g e tempo de 300 s. Após este tempo de contato, o braço móvel começa a retornar até a separação completa. A força

necessária para romper este contato entre as duas interfaces (mN), bem como a distância de destacamento (mm) e trabalho necessários (mN.mm) são determinados com auxílio do *software* Exponent. Em caráter comparativo, um hidrogel de Carbopol® Ultrez 0,5%, que apresenta potencial bioadesivo relatado na literatura, foi empregado (FRANK et al., 2014).

4.2.9 Atividade anti-inflamatória

4.2.9.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25 e 30 g (n total = 30) mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 h. Os animais foram alimentados com ração padrão e água a vontade. Pelo menos 1 h antes do início dos experimentos os animais foram ambientados a sala experimental. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8 e 17 h e de acordo com os guias éticos de manejo de animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (processo número 6906220917/2017). Todos os experimentos foram conduzidos de forma cega e por um único experimentador. O número de animais e a quantidade de agente irritante empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos.

4.2.9.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O edema de orelha foi induzido por uma aplicação tópica única do agente irritante óleo de cróton (diluído em 20 μ L de acetona) na orelha direita do animal a uma concentração de 1 mg/orelha (BRUM et al., 2016, PIANA et al., 2016).

4.2.9.3 Tratamento

De forma a avaliar o efeito anti-inflamatório tópico dos tratamentos, a orelha dos animais foi tratada topicamente com 15 mg das formulações desenvolvidas imediatamente após a aplicação do óleo de cróton. Os animais foram divididos em

nove grupos contendo de 6 a 8 animais cada: naïve (sem tratamento); óleo de cróton, óleo de cróton + veículo, óleo de cróton + hidrogel contendo a SB não-nanoencapsulada (HP-SB); óleo de cróton + hidrogel contendo o óleo de romã não-nanoencapsulado (HP-OR); óleo de cróton + hidrogel contendo SB e óleo de romã não-nanoencapsulados (HP-SB OR); óleo de cróton + hidrogel contendo nanocápsulas de óleo de romã (HP-NC B); óleo de cróton + hidrogel contendo nanocápsulas de SB e óleo de romã (HP-NC SB) e óleo de cróton + acetato de dexametasona (1 mg/g) (controle positivo).

4.2.9.4 Medida de edema de orelha

A espessura da orelha dos animais foi medida utilizando o micrômetro digital antes da aplicação do óleo de cróton. Os animais foram previamente anestesiados com cetamina/xilazina (90 mg/kg + 30 mg/kg, respectivamente) e após, o micrômetro foi posicionado próximo a extremidade da orelha, distante dos sulcos cartilagosos. O edema de orelha induzido por óleo de cróton foi caracterizado por um aumento da espessura da orelha em 6 h após aplicação do mesmo (período de máximo efeito edematogênico do óleo de cróton) ou óleo de cróton + tratamentos. A diferença entre a medida basal e a medida em 6 h foi expressa em μm . De maneira a reduzir a variação entre as análises, somente um único avaliador conduziu as medidas.

4.2.9.5 Análise histológica

Seis horas após aplicação do óleo de cróton + tratamentos, as orelhas foram coletadas para análises histológicas. Previamente, os animais foram eutanasiados, as orelhas foram retiradas e fixadas em uma solução contendo etanol 80%, formaldeído 40% e ácido acético (16:2:1) (solução ALFAC). Após as amostras foram embebidas em parafina, seccionadas em fatias de 5 μm e coradas com hematoxilina-eosina. Para análise microscópica qualitativa da resposta celular inflamatória, uma área representativa foi selecionada e a resposta celular inflamatória foi analisada empregando lentes objetivas de 20x (OLIVEIRA et al., 2014). Somente um avaliador conduziu esta análise, para minimizar as fontes de erro.

4.2.10 Ensaio de biometria cutânea

No estudo de biometria cutânea foram avaliados os hidrogéis contendo a SB nanoencapsulada (HP-NCSB) e os hidrogéis contendo o ativo não-nanoencapsulado (HP-SB) ao serem aplicados topicamente em 15 voluntários de ambos os sexos após a aprovação no Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE: 77511317.5.0000.5346). Primeiramente, os voluntários foram orientados sobre o experimento, questionados se haviam feito uso de algum produto no local ou se apresentavam alguma alergia, bem como a ler o Termo de Confidencialidade (apêndice A) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice B). Após a leitura dos termos e estarem adaptados à temperatura e umidade do ambiente, os voluntários foram acompanhados para a lavagem do antebraço com sabão neutro e secos delicadamente com papel toalha. Círculos de tamanho padronizado foram feitos na área, sendo um círculo destinado à aplicação do HP-SB, outro ao HP-NCSB e outro como área controle, porém antes da aplicação todos os parâmetros foram medidos. As formulações aplicadas nas áreas delimitadas ficaram em contato com a pele por 30 min (CONTRI et al., 2014).

Após este tempo de contato, as formulações foram removidas e os parâmetros biométricos foram determinados nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 180 min. A irritação da pele (avaliada pelo aparecimento ou não de eritema) foi verificada empregando a sonda eletrônica Mexameter[®], bem como uma análise sensorial foi executada simultaneamente através de questionamentos aos voluntários (apêndice C). Utilizando os equipamentos Skin-pH-Meter[®], Tewameter[®] e Corneometer[®] foram avaliados os parâmetros de pH cutâneo, perda transepidermal de água e umidade do estrato córneo, respectivamente.

4.2.11 Análise estatística

As formulações foram preparadas e analisadas em triplicata, sendo seus resultados expressos como média \pm desvio padrão, incluindo a análise de variância ANOVA e Teste *t*. Para o teste de biometria cutânea, análise de variância ANOVA de medida repetida seguida pelo pós-teste de Tukey foi empregada. Os resultados das avaliações *in vivo* nos camundongos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), os quais foram reportados como média geométrica + seus respectivos

limites de confiança de 95%. O efeito inibitório máximo ($E_{m\acute{a}x}$) foi calculado em relação as respostas do grupo controle. A análise estatística foi realizada por análise variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Todos os testes foram conduzidos utilizando o *software* Graph Pad Prism 6.0 (San Diego, EUA), com exceção do estudo de biometria cutânea, para o qual o *software* Statistica foi empregado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SEMISSÓLIDOS

O aspecto macroscópico dos hidrogéis pode ser observado na figura 8. Todas as formulações apresentaram aspecto visual homogêneo, sendo que o HP-NCSB e HP-NCB apresentam cor branco-leitosa, muito semelhante à suspensão de NC, enquanto que HP-SB tem aspecto levemente opalescente e amarelado. Cabe mencionar que a concentração utilizada de Pemulen® TR2 de 0,7% foi escolhida a partir da realização de estudos pilotos que foram conduzidos com outras duas concentrações, de 0,4% e 1,0%, porém estas formulações não apresentaram consistência adequada para administração cutânea. Verificou-se que em 0,4% o hidrogel escoava muito facilmente sobre a pele e em 1,0% o hidrogel era muito consistente, especialmente frente à concentração de 0,7% que apresentou um aspecto muito satisfatório.

Figura 8. Aspecto macroscópico dos hidrogéis HP-NCB (A), HP-NCSB (B) e HP-SB (C).



Os resultados obtidos na caracterização físico-química estão representados na tabela 2. O doseamento de SB, tanto para o HP-NCSB como para o HP-SB apresentou valores próximos a concentração teórica de 1 mg/g e não houve variação significativa entre os mesmos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Características físico-químicas das formulações desenvolvidas (média \pm desvio padrão, n=3, teste *t* e ANOVA).

Formulação	Teor (mg/g)	pH	DM (nm)*	IPD**
HP-NCSB	0,99 \pm 0,01	6,70 \pm 0,15	184 \pm 26	0,22 \pm 0,04
HP-NCB	-	6,72 \pm 0,34	161 \pm 20	0,22 \pm 0,03
HP-SB	0,98 \pm 0,02	7,26 \pm 0,24	-	-

*DM: diâmetro médio; **IPD: índice de polidispersão.

A avaliação do pH permitiu constatar valores levemente ácidos para os géis contendo a suspensão de NC e valor próximo a neutralidade para HP-SB, porém neste parâmetro também não houve diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$). O pH cutâneo levemente ácido confere um potencial bactericida e fungicida, além de que para que haja a renovação natural dos corneócitos é fundamental que o pH nesta faixa seja mantido, garantindo que as enzimas serina proteases executem sua função. Assim, pode-se dizer que as formulações desenvolvidas apresentam-se adequadas para aplicação na pele (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002; BLAAK et al., 2017). Em outros trabalhos que desenvolveram hidrogéis contendo NC para uso cutâneo, como os desenvolvidos por Rigo e colaboradores (2015) e Ourique e colaboradores (2011), também foram encontrados valores de pH nesta faixa.

Em relação ao tamanho médio das partículas dos géis HP-NCSB e HP-NCB, verificou-se que apresentaram tamanho na faixa submicrométrica, sem variação significativa entre si ($p > 0,05$). Com base nestes resultados, pode-se dizer que a formulação desenvolvida é adequada para a aplicação cutânea, uma vez que devido seu tamanho reduzido, são capazes de depositar-se no tecido, tendo íntimo contato com o estrato córneo e também aumentar a permeação das substâncias de interesse (VERMA et al., 2003; BOUCHEMAL et al., 2004; JENNING et al., 2000). Ainda, foi possível confirmar que a presença do ativo SB não proporcionou aumento significativo no tamanho apresentado pelas nanoestruturas. Outro aspecto importante está centrado no fato de que o tamanho de partícula não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tamanho das nanoestruturas em suspensão (157 \pm 3 nm para as NC contendo SB e 160 \pm 7 nm para as NC omitindo-se a SB), e após a incorporação no hidrogel, o que sugere que a forma farmacêutica proposta mantém a integridade das NC quando preparadas, sem deixar de mencionar

que as NC desenvolvidas apresentaram tamanho de partícula compatível ao apresentado comumente quando se faz uso da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado para sua preparação (COUVREUR et al., 2002; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Com relação ao IPD, este indica a homogeneidade de tamanho das partículas presentes na formulação, que conforme descrito em estudos deve apresentar valores próximos a 0,2 (DA SILVEIRA et al., 2013; OURIQUE et al., 2008; ALVES et al., 2007). Desta forma, Os valores de IPD dos hidrogéis HP-NCSB e HP-NCB demonstraram valores bastante satisfatórios, indicando uniformidade na distribuição de tamanho, principalmente quando pensa-se na eficácia terapêutica das formulações, para a qual uma distribuição unimodal de nanopartículas auxiliará na promoção do resultado esperado.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

Com o objetivo de verificar como as formulações de uso tópico comportam-se ao serem aplicadas sobre a pele, determinou-se o fator de espalhabilidade das formulações. Com base nos resultados descritos na tabela 3 e também na figura 9, pode-se observar que as formulações apresentam fator de espalhabilidade muito semelhantes entre si e conforme análise estatística não houve variação significativa entre as três formulações. Assim, notou-se que a utilização da suspensão de NC no desenvolvimento dos géis não interferiu na espalhabilidade da forma farmacêutica ($p > 0,05$).

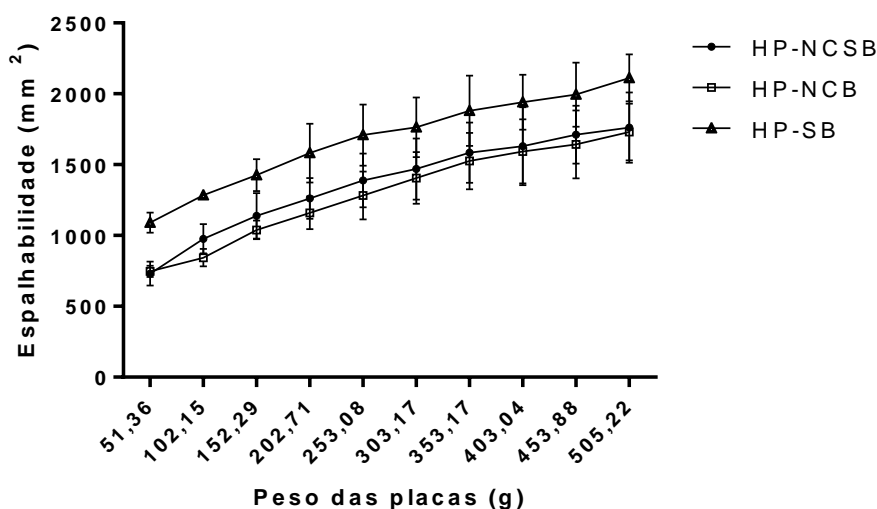
Tabela 3. Determinação do fator de espalhabilidade (média \pm desvio padrão, n=3, ANOVA).

Formulação	Fator de espalhabilidade (mm²/g)
HP-NCSB	3,49 \pm 0,49
HP-NCB	3,42 \pm 0,40
HP-SB	4,18 \pm 0,33

Para que os efeitos terapêuticos sejam alcançados, a dose correta de uma formulação deve ser aplicada e isto somente é possível se houver facilidade na administração da mesma, proporcionando assim não só o sucesso do tratamento, mas

também garantindo a aceitabilidade e adesão do paciente. Assim sendo, os valores de espalhabilidade obtidos neste estudo assemelham-se aos encontrados em outros trabalhos que também incorporaram suspensões de nanopartículas em formulações semissólidas (FONTANA et al., 2011; RIGO et al., 2015; DE LIMA, 2015). Ainda, é frequentemente observado na literatura, assim como foi visto neste estudo, que os hidrogéis contendo nanopartículas apresentam menor espalhabilidade em relação aos hidrogéis contendo fármaco não-nanoencapsulado (MARCHIORI et al., 2010; RIGO et al., 2015; DE LIMA, 2015).

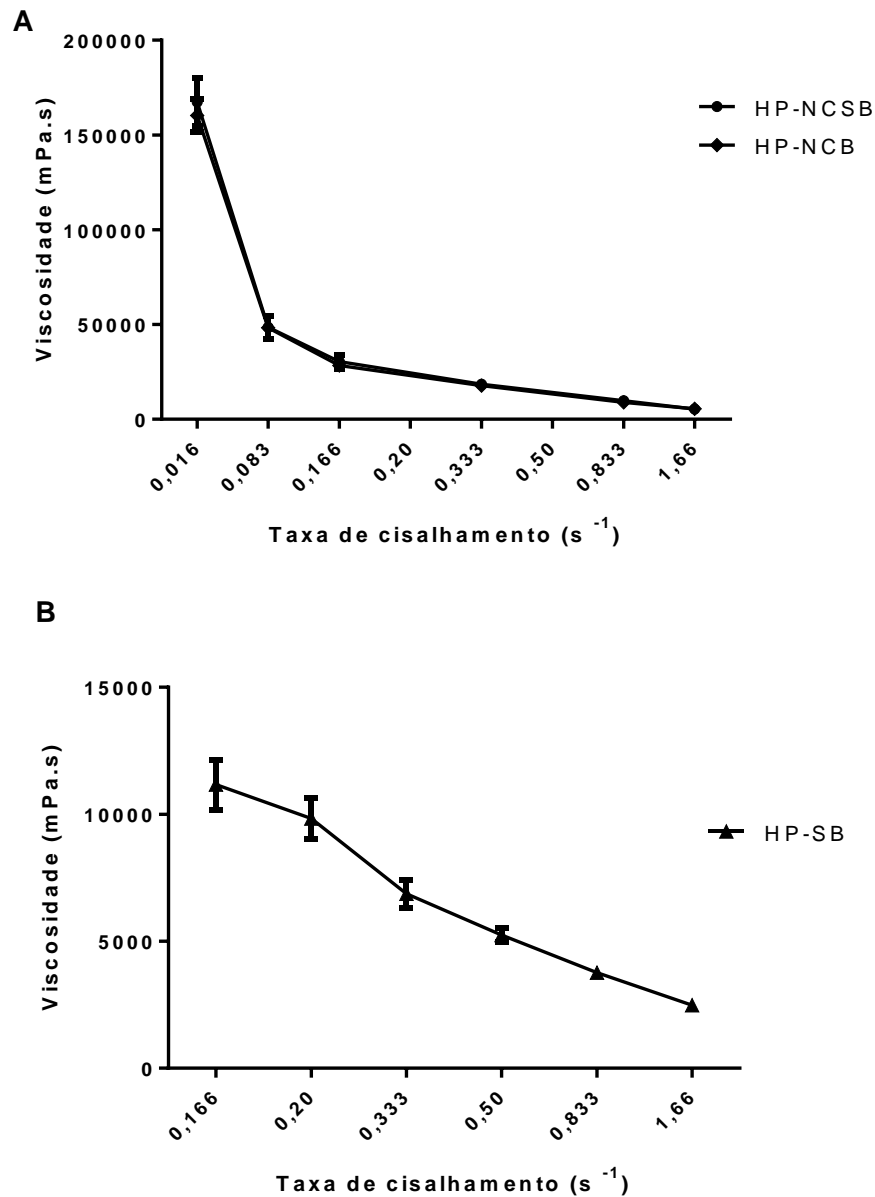
Figura 9. Perfil de espalhabilidade das formulações HP-NCSB, HP-NCB e HP-SB (média \pm desvio padrão, n=3).



5.3 AVALIAÇÃO REOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS

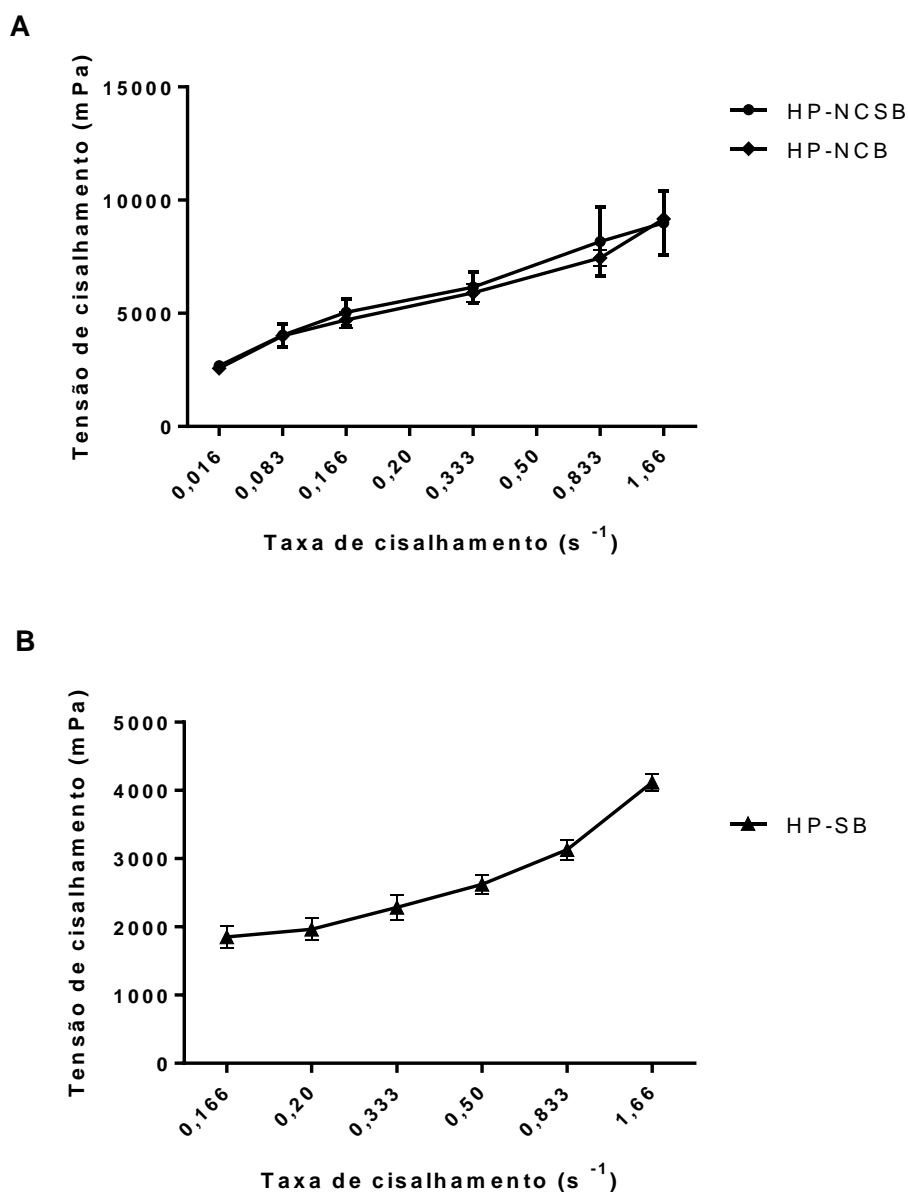
A figura 10 mostra o viscograma dos hidrogéis, o qual foi obtido a partir da plotagem da viscosidade (cP ou mPa.s) pela taxa de cisalhamento (s^{-1}). Com base nos resultados observados nos viscogramas pode-se concluir que as formulações apresentaram comportamento não-newtoniano, uma vez que a viscosidade diminui a medida que a taxa de cisalhamento aumenta. O mesmo pode ser observado na figura 11 que demonstra o reograma dos hidrogéis desenvolvidos. Portanto, formulações que tenham sua viscosidade diminuída com o aumento da força aplicada demonstram que a estrutura tridimensional e embaraçada destas moléculas é rompida, facilitando o fluxo ao exercer uma força sobre elas (AULTON, 2016; FONTANA et al., 2011).

Figura 10. Representação gráfica do viscograma referente às formulações (A) HP-NCSB, HP-NCB e (B) HP-SB (média \pm desvio padrão, n=3).



Outros trabalhos também relatam o comportamento não-newtoniano para as formulações semissólidas preparadas incorporando suspensões de nanocarreadores, os quais demonstram que, independentemente da formulação semissólida conter nanopartículas ou ter sido preparada com o fármaco não-nanoencapsulado, não houve alteração do tipo de fluxo do sistema (MELERO et al., 2014; FONTANA et al., 2011; RIGO et al., 2015).

Figura 11. Reograma referente às formulações (A) HP-NCSB, HP-NCB e (B) HP-SB (média \pm desvio padrão, n=3).



Para melhor compreender e confirmar o comportamento observado a partir dos reogramas das formulações, quatro modelos reológicos foram avaliados utilizando as suas respectivas equações (Bingham, Casson, Ostwald e Hershel-Bulkley) (tabela 4). Assim, pode-se concluir através do coeficiente de regressão (r) resultante para cada modelo que o mais adequado e, portanto o que apresentou o coeficiente de regressão mais elevado foi o de Ostwald, para todas as formulações. Este modelo frequentemente descreve o fluxo não-newtoniano pseudoplástico, assim como o de Hershel-Bulkley, porém o modelo de Ostwald não necessita de tensão de cisalhamento mínima para iniciar o fluxo (FERREIRA, 2008).

Tabela 4. Coeficiente de regressão (r) para as diferentes modelagens (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Hershel-Bulkley
HP-NCSB	0,9013 \pm 0,036	0,9572 \pm 0,020	0,9939 \pm 0,003	0,9877 \pm 0,009
HP-NCB	0,9418 \pm 0,016	0,9771 \pm 0,009	0,9981 \pm 0,002	0,997 \pm 0,001
HP-SB	0,9872 \pm 0,004	0,9931 \pm 0,009	0,9951 \pm 0,005	0,9948 \pm 0,007

Essa característica de pseudoplasticidade é comum em formulações para a aplicação cutânea e diferentes estudos encontrados na literatura demonstram esse resultado (SHAWESH et al., 2003; MELERO et al., 2014; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; OURIQUE et al., 2011). No trabalho desenvolvido por Correa e colaboradores (2005) foram avaliados diferentes géis hidrofílicos (Pemulen[®], Carbopol[®] 940 e Carbopol[®] Ultrez) e, através dos reogramas e do índice de fluxo, observou-se que todos apresentaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico.

Esse tipo de propriedade reológica apresentada pelos hidrogéis desenvolvidos é bastante desejável tendo em vista que se propõe a administração cutânea dos mesmos. É interessante que estas formulações sejam capazes de fluir e espalhar com facilidade na área aplicada. O contrário é visto em formulações que apresentam comportamento newtoniano, como as suspensões de nanopartículas, que são bastante fluidas, espalham rapidamente sobre a pele dificultando a aplicação e, desta forma, podem comprometer a uniformidade de aplicação (RIGO et al., 2015).

Através do índice de fluxo (n) podemos determinar o comportamento de um fluido não-newtoniano, pois é sabido que quanto mais se aproximar de 1, menos pseudoplástico é, consequentemente, se o n for menor que 1 o fluxo é pseudoplástico (AULTON, 2016). O índice de consistência (K), assim como o n , é fundamental para caracterizar formulações em estudo. Observando-se os resultados do índice de consistência (tabela 5) verifica-se que o HP-SB apresentou a menor consistência dentre os hidrogéis, resultado este que é compatível com o perfil de viscosidade desta formulação o qual teve valores inferiores aos dos HP-NCSB e HP-NCB. Os valores de n encontrados em nosso estudo assemelham-se aos descritos por Alves; Pohlmann;

Guterres (2005), principalmente em relação ao gel contendo NC. O estudo citado anteriormente é semelhante a este trabalho também, pois os géis desenvolvidos continham Carbopol 940[®], um polímero derivado do ácido acrílico, que requer a incorporação de trietanolamina para formar a rede tridimensional característica de um gel, assim como o Pemulen[®] TR2 (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; MARCHIORI et al., 2010).

Tabela 5. Índice de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos hidrogéis (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Formulação	n	K
HP-NCSB	0,26 \pm 0,02	164934,50 \pm 13937,20
HP-NCB	0,27 \pm 0,01	157679,70 \pm 10348,38
HP-SB	0,37 \pm 0,02	49404,15 \pm 6528,26

Ademais, pode-se correlacionar o fator de espalhabilidade com a consistência do hidrogel, uma vez que a consistência e a espalhabilidade do veículo são inversamente proporcionais e seu estudo em conjunto torna-se pertinente e é incentivado e explorado em trabalhos deste meio acadêmico. Ou seja, aumentando a viscosidade da formulação podemos até aumentar o tempo de retenção, porém a espalhabilidade e a garantia de uniformidade de aplicação ficam comprometidas (GARG et al., 2002).

5.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA SILIBININA A PARTIR DOS HIDROGÉIS

Neste estudo foram empregadas células de difusão vertical tipo *Franz* e membrana sintética de ésteres mistos de celulose (acetato e nitrato de celulose), que são comumente utilizadas para esta avaliação e também preconizadas por agências internacionais como o FDA (DA SILVA et al., 2009). O processo envolvendo a liberação da substância ativa a partir de NC engloba uma série de fatores, tais como: massa molecular, concentração de polímero, natureza do óleo, tamanho da NC e também as condições do ensaio como temperatura, pH do meio escolhido, tempo de contato, entre outros fatores (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Contudo, este processo de liberação não se dá somente em relação ao fármaco liberado a partir da NC, mas também da NC a partir da forma farmacêutica. Devido a este evento, as alíquotas coletadas do meio de liberação de HP-NCSB foram diluídas com metanol para que o polímero envolvendo o nanossistema fosse solubilizado e então pudéssemos quantificar corretamente a SB liberada. No trabalho de Vargas e colaboradores (2013) também foi utilizado solvente orgânico, neste caso a acetonitrila uma vez que as NC tinham como polímero a poli(ϵ -caprolactona) para que o fármaco que está sendo liberado na forma nanoencapsulada fosse quantificado. Da mesma forma como ocorreu em nosso estudo, notou-se a diferença nas quantidades totais de fármacos liberadas, as quais foram superiores quando adicionou-se o solvente orgânico.

De maneira a comprovar estes acontecimentos optou-se por verificar em um dos meios receptores empregados a presença das NC. O meio receptor escolhido foi o tampão fosfato pH 5,5 e etanol. Estes foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons de forma que, ao final do experimento, foram coletados e analisados. Estes resultados podem ser observados nas figuras 12, 13 e 14, nas quais podemos concluir que o meio antes do início do experimento não apresentava partículas em escala nanométrica, diferentemente do meio coletado posteriormente ao experimento. Este continha partículas nanométricas, comprovando-se assim que os hidrogéis desenvolvidos foram capazes de permitir a saída das NC para que então desempenhem sua atividade na pele.

Figura 12. Distribuição do tamanho de partículas presentes no meio receptor tampão fosfato pH 5,5 e etanol.

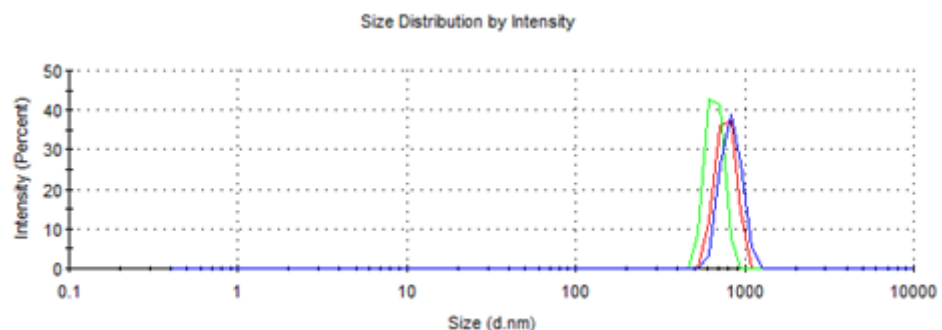


Figura 13. Distribuição do tamanho das partículas do meio receptor obtido após 8 h de experimento a partir do HP-NCSB em meio receptor de tampão fosfato pH 5,5 e etanol.

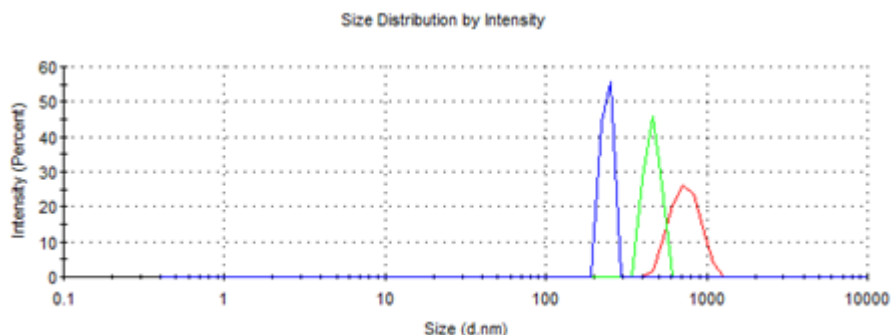
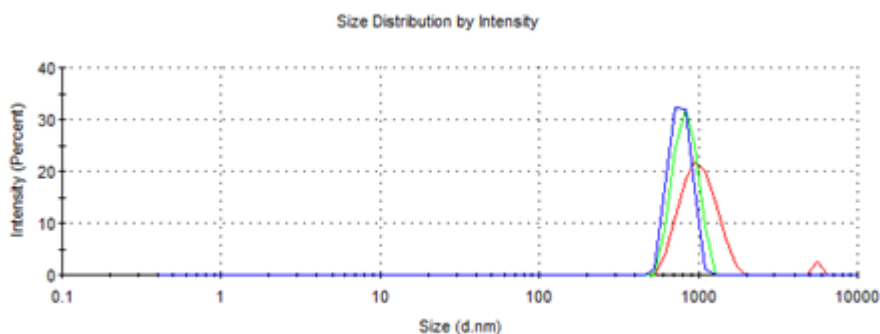


Figura 14. Distribuição do tamanho das partículas presentes no meio receptor obtido após 8 h de experimento a partir do HP-SB em meio receptor de tampão fosfato pH 5,5 e etanol.

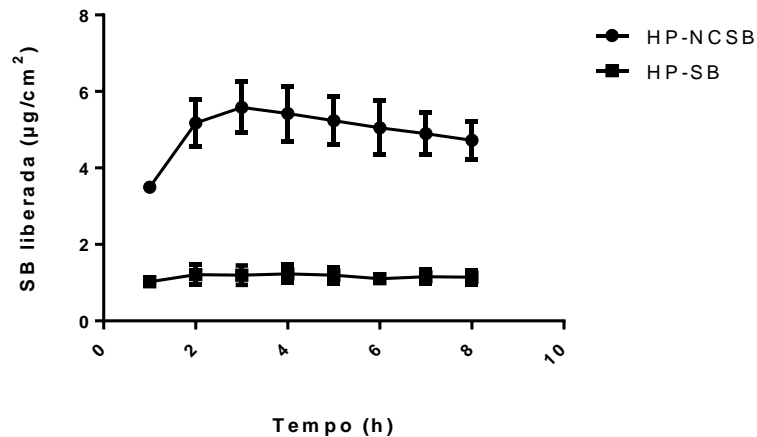


O experimento realizado seguiu-se por oito horas, com coletas a cada hora e a quantidade de fármaco liberada a partir dos hidrogéis foi calculada em função do volume do meio receptor (6 mL) e da área da membrana. Como meios foram escolhidos o tampão fosfato pH 5,5, a fim de simular as condições fisiológicas da pele, e o mesmo tampão acrescido de etanol (70:30) para aumentar a solubilidade da SB no meio e atender a condição *sink*. A utilização do etanol para a manutenção da condição *sink* já foi descrita por outros autores (MELERO et al., 2014; MENDONÇA et al., 2009; ANDRADE; FONTANA; BECK, 2014).

Nestas condições, pode-se observar nas figuras 15 e 16 que, tanto para o meio contendo somente o tampão como no meio com etanol, a quantidade de SB liberada a partir da formulação HP-NCSB foi significativamente superior a da formulação HP-SB. Diante disto, pode-se dizer que a nanoencapsulação foi responsável por aumentar a “saída” do ativo do hidrogel. Ao incorporarmos a SB ao nanocarreador, este cumpriu o seu papel em modificar as características do ativo, considerando-se que a SB tem

baixa solubilidade em água, e então melhorou consideravelmente a sua liberação a partir de uma formulação com características hidrofílicas.

Figura 15. Quantidade de ativo liberada em função da área da membrana ao longo do tempo, utilizando como meio receptor tampão fosfato pH 5,5 e etanol (média \pm desvio padrão, n=3).



Esta observação é corroborada pela avaliação das formulações HP-SB por microscopia óptica, na qual foi possível ver que a SB, na sua forma livre, agrega-se na formulação e que não apresenta, portanto distribuição homogênea, o que ocorre em função da sua lipofilia (figura 17).

Figura 16. Quantidade de ativo liberada em função da área da membrana ao longo do tempo, utilizando como meio receptor tampão fosfato pH 5,5 (média \pm desvio padrão, n=3).

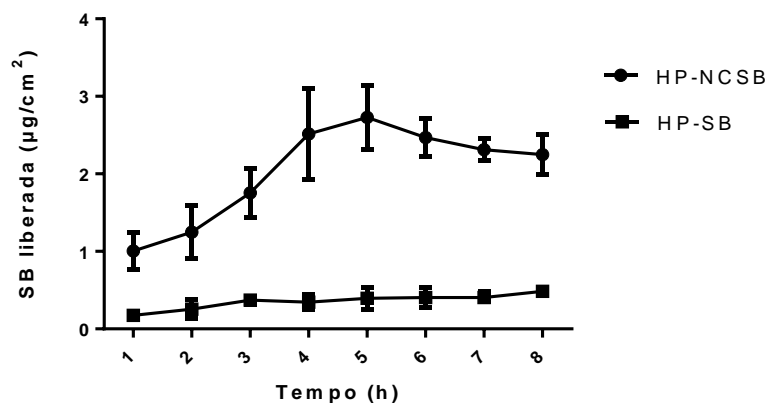
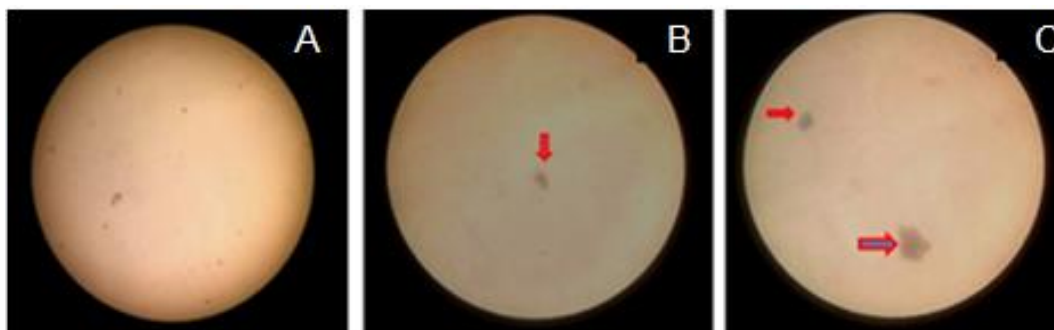


Figura 17. Microscopia ótica dos HP-SB (A em aumento de 10x, mostrando várias cristalizações de SB e B e C em aumento de 45x, também mostrando as cristalizações de SB).



Além disso, pode-se perceber que há diferenças na liberação do fármaco modificando-se as condições experimentais. O meio contendo apenas tampão fosfato pH 5,5, teve menor quantidade de fármaco liberada, em comparação com o outro meio contendo o etanol. Esta observação nos leva, portanto, a refletir sobre a possibilidade da adição do solvente orgânico para alcançar a condição *sink*, poder forçar a liberação e superestimar a quantidade de ativo liberada. Além disso, neste tipo de experimento existe a retirada frequente do meio receptor e imediata reposição com meio fresco.

Em relação às quantidades totais de ativo liberado a partir da formulação, após oito horas de experimento, utilizando tampão fosfato e etanol, os valores médios obtidos foram de $4,73 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ para a formulação HP-NCSB e de $1,14 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ para a formulação HP-SB. Para o meio composto apenas por tampão obteve-se os resultados de $2,25 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ a partir da formulação HP-NCSB e $0,49 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ para a formulação HP-SB, notando-se assim que existe significativa diferença entre os resultados totais encontrados em ambos os meios ($p < 0,05$). Também, em termos de quantidades totais liberadas pode-se notar que, em ambos os meios, as formulações que apresentavam a SB nanoencapsulada tiveram uma liberação aproximadamente 4 vezes superior do ativo que as demais. Essa equivalência nos permite inferir que para análise comparativa entre os géis nanoestruturados e convencionais, os meios conduzem a um mesmo resultado.

Por fim, cabe ressaltar que as NC são reconhecidamente capazes de veicular ativos e aumentar a retenção destes na pele, promover liberação sustentada, modificar características físico-químicas do ativo e, para as formulações destinadas a aplicação dérmica, tanto características de liberação imediata ou controlada de

fármacos são interessantes (SCHAFFAZICK et al., 2003; JENNING et al., 2000; ALVES, 2006; FRANK et al., 2015). Assim, em nosso estudo, onde não foi observada uma linearidade de SB sendo liberada ao longo do tempo e controle de liberação, os resultados podem ser considerados bastante interessantes, uma vez que tal nanossistema foi capaz de veicular e aumentar a liberação da SB a partir da formulação desenvolvida.

Para os experimentos em células de *Franz*, o guia do FDA e a literatura científica sugerem o emprego de um excesso de ativo no compartimento doador (dose infinita). A massa de hidrogel requerida para ter uma dose infinita, ultrapassa a capacidade de espalhamento da área de difusão da célula, ou seja, não há o contato de toda alíquota na membrana de difusão. No uso clínico, normalmente as formulações são aplicadas e espalhadas até formar um fino filme sobre a pele. Estamos, com isso, supondo que a difusão do ativo não será limitada pelo término da dose no meio doador. Porém, em caso de semissólidos, a viscosidade pode exercer uma importante influência sobre o movimento dos fármacos em direção ao meio de liberação. Podemos inferir que por haver uma rede tridimensional que confere uma resistência ao fluxo (viscosidade), a SB ou NC de SB encontram certa dificuldade em permear essa estrutura e atingir as regiões próximas a membrana para então atingir o meio receptor, por isso forma-se um platô, ou uma discreta ascendência nos gráficos de quantidade x tempo. A consistência (K) do hidrogel de SB livre foi menor, assim como a quantidade de ativo que atinge o meio receptor, o contrário foi observado para o hidrogel contendo NC de SB. Nesse aspecto a influência da viscosidade não é relevante. A maior quantidade de SB que é liberada da formulação se deve de fato ao nanoencapsulamento, que modificou a solubilidade e possivelmente homogeneizou a distribuição da SB pela forma farmacêutica. Por fim, o protocolo experimental pode ser considerado bem sucedido, pois ele possibilitou, em condições distintas de polaridade do meio, discriminar o comportamento dos géis, convergindo sobre a amplitude da liberação.

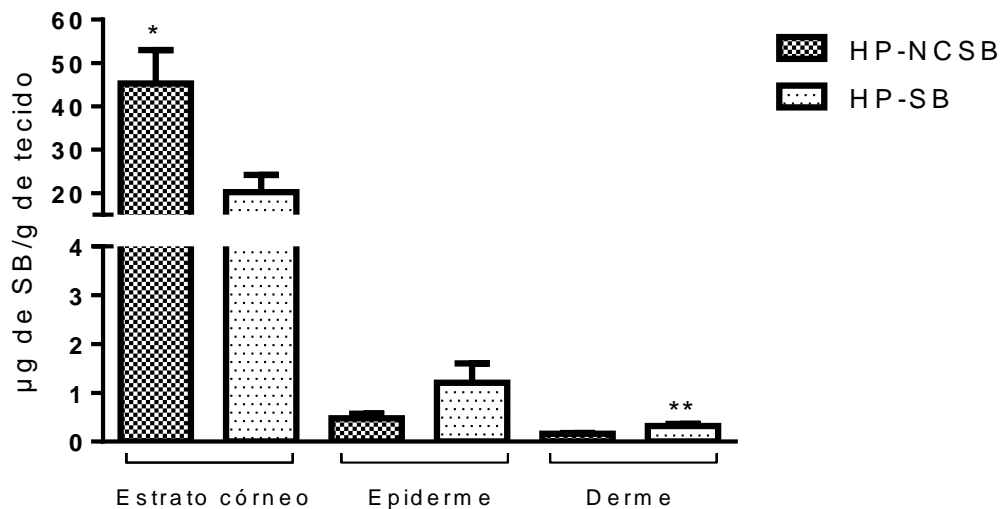
5.5 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Na literatura envolvendo o transporte de substâncias ativas em nanocarreadores para a via tópica, é muito comum a aplicação de estudos de permeação cutânea. Nosso experimento utilizou a pele humana, considerada uma

membrana de primeira escolha para este tipo de avaliação, pois implica uma maior confiabilidade na interpretação dos resultados, possibilitando a comparação do desempenho de deposição do ativo nas camadas da pele. Assim, neste estudo observou-se que a quantidade total de SB retida na pele a partir das formulações HP-NCSB e HP-SB foi de $2,85 \pm 0,30 \mu\text{g}$ e $1,79 \pm 0,18 \mu\text{g}$, respectivamente ($p < 0,05$). Como em outros trabalhos que estudaram a permeação de ativos nanoencapsulados utilizando pele humana, optou-se por demonstrar a quantidade de SB presente em cada camada cutânea (FRIEDRICH et al., 2015; ALVES et al., 2007).

Na figura 18, demonstra-se que a nanoencapsulação promoveu maior retenção de SB no estrato córneo, frente ao hidrogel contendo o ativo livre. Essa característica pode ser explicada pelo fato do estrato córneo funcionar como um “depósito” para nanoestruturas, como já foi observado em trabalhos anteriores, e assim permitir uma liberação gradual do ativo para as camadas subsequentes, mostrando um comportamento importante quando envolve tratamento de doenças inflamatórias da pele, como a dermatite de contato irritativa, na qual após o agente irritante danificar a superfície cutânea, iniciam processos de liberação de mediadores inflamatórios pelas células epidérmicas, além de que esse perfil de liberação pode proporcionar uma terapia mais eficiente (MARTO et al., 2018; KAUR et al., 2017). Essa característica de retardar a passagem de ativos para camadas mais profundas e absorção sistêmica (compartimentos receptores) por nanopartículas poliméricas tem sido relatada na literatura (ALVES et al., 2007; WEISS-ANGELI et al., 2010). Ademais, este resultado é corroborado pelo trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, o qual aborda hidrogéis desenvolvidos com o polímero goma gelana e que também contém NC de SB e óleo de romã (MARCHIORI et al., 2017). O citado estudo verificou durante a permeação cutânea que a SB quando nanoencapsulada ficou retida predominantemente no estrato córneo e epiderme quando comparada com a formulação que veiculava a SB em sua forma livre.

Figura 18. Distribuição da SB nas camadas cutâneas (média \pm desvio padrão, n=5, teste *t*, **p* < 0.05).



A SB a partir da formulação HP-SB, em comparação com HP-NCSB, mostrou uma tendência mais pronunciada de ir à derme, o que reforça a hipótese de que devido à nanoencapsulação há uma maior interação com o estrato córneo, devido à sua alta área superficial, entre outras propriedades, que podem aumentar esta retenção, bem como o fato de que o material polimérico escolhido a partir da NC é etilcelulose, polímero com características hidrofóbicas que podem auxiliar no controle de liberação para as camadas mais profundas da pele (BECK et al., 2011; IQBAL et al., 2002; BALZUS et al., 2017). Outro aspecto reforça as características observadas neste trabalho, o qual refere-se à polaridade das camadas cutâneas, pois o estrato córneo e a epiderme representam camadas mais apolares que a derme. Sendo as NC estruturas hidrofóbicas, estas terão uma maior afinidade pelas camadas mais superiores da pele, conforme observado não só no presente estudo, mas no de MARCHIORI (2017) também.

Quanto ao meio receptor, para ambas as formulações, a quantificação de SB foi pequena e sem diferença estatística significativa entre elas, indicando que a nanoencapsulação não aumentou a tendência à absorção sistêmica, da mesma forma que outros estudos semelhantes já descreveram (BEBER et al., 2016; CONTRI et al., 2014).

5.6 BIOADESÃO

Na área dermatológica, ao desenvolver uma formulação tem-se o objetivo de que esta fique sobre o local de ação desejado por tempo suficiente para executar seu efeito terapêutico. Assim, polímeros capazes de aumentar essa adesão ao tecido cutâneo vem sendo amplamente empregados. Para o desenvolvimento dos nossos hidrogéis optou-se pelo copolímero ácido poliacrílico, Pemulen® TR2, que apresenta alto peso molecular, boa estabilidade e compatibilidade com a pele. De forma a verificar se este polímero poderia conferir uma maior bioadesão ao ser empregado no desenvolvimento de hidrogel veiculador de NC, analisou-se através do método de força de destacamento, a força necessária para romper a interação entre o hidrogel e a membrana modelo escolhida.

Assim, foram avaliadas a força de adesão (mN), distância de separação (mm) e trabalho de adesão (mN.mm) comparando as formulações HP-NCSB, HP-SB a um hidrogel de Carbopol Ultrez® 0,5%, que também é utilizado como polímero bioadesivo (tabela 6). A formulação HP-NCSB destacou-se significativamente quando comparada ao hidrogel Carbopol Ultrez® 0,5% ($p < 0,05$) para os parâmetros de força e trabalho de adesão. O polímero Carbopol® Ultrez, é descrito em vários trabalhos com apelo bio/mucoadesivo e, apesar de ambos os polímeros serem derivados do ácido acrílico, o Pemulen® tem em sua cadeia uma porção metacrilato, que confere a ele um caráter também lipofílico, o que pode ter auxiliado em sua interação com as camadas superiores da pele, visto que o estrato córneo e epiderme são camadas mais apolares (BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

Além disso, a literatura já aponta o Pemulen® TR2 como um polímero formador de gel que tem potencial bio/mucoadesivo (DIAS et al., 2007). No entanto, como mencionando no item 3.3, não há estudos na área propondo a utilização deste polímero para o desenvolvimento de hidrogéis para aplicação na pele, tampouco veiculando suspensões de NC. Assim, este trabalho observou também com base em outros estudos científicos empregando polímeros para desenvolvimento de hidrogéis contendo nanossistemas, que os resultados obtidos estão de acordo com formulações caracterizadas como bioadesivas, como pode ser observado no trabalho de Frank e colaboradores (2017). Neste estudo de Frank e colaboradores (2017), foi desenvolvido hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NC de imiquimod revestidas de quitosana e, em relação ao trabalho de adesão obtido, o qual é relatado como o

indicativo de propriedade mucoadesiva, um valor de 78 mN.mm foi encontrado, sendo que este valor é superado pelos hidrogéis de Pemulen® desenvolvidos em nosso trabalho.

Tabela 6. Parâmetros bioadesivos dos hidrogéis (média \pm desvio padrão, n=3, ANOVA; letras diferentes para o mesmo parâmetro indicam que há diferença estatisticamente significativa).

Parâmetro	HP-SB	HP- NCSB	HC*
Força de adesão (mN)	90 \pm 20 ^{ab}	130 \pm 30 ^b	60 \pm 0 ^a
Distância de separação (mm)	3,76 \pm 0,38 ^a	5,46 \pm 0,23 ^b	4,87 \pm 0,21 ^b
Trabalho (mN.mm)	69,65 \pm 15,63 ^a	120,14 \pm 7,25 ^b	90,20 \pm 5,15 ^a

*HC: hidrogel de carbopol.

Em relação ao desempenho do HP-NCSB frente ao HP-SB, podemos evidenciar a contribuição da nanoencapsulação, pois também apresentou resultados importantes, observando-se os maiores trabalhos de adesão e distância de separação do tecido cutâneo, conforme apresentado na tabela 6 ($p < 0,05$). O trabalho de adesão, que é obtido através da área sob a curva, reflete o trabalho total durante a retirada da sonda e, estudos da área muitas vezes fazem uso deste parâmetro para conduzir suas análises comparativas. É o caso, por exemplo, do recente trabalho de Chaves e colaboradores (2018), no qual para uma comparação da performance mucoadesiva entre três diferentes substratos (mucina, mucosa bucal e mucosa vaginal), três diferentes polímeros para as NC (Eudragit® RS100, Eudragit® S100 e poli(ϵ -caprolactona) e três diferentes veículos (suspensão, hidrogel, pó) seus respectivos resultados de trabalho de adesão foram utilizados. Neste sentido, principalmente no aspecto do trabalho necessário para romper a interação bioadesiva, no qual o melhor resultado foi do hidrogel contendo as NC, podemos inferir que as nanoestruturas contribuíram para a bioadesividade, uma vez que seu invólucro polimérico consiste de etilcelulose, um polímero hidrofóbico que apresenta alguns sítios de hidroxilas reativas, podendo assim interagir com as camadas superficiais da pele e contribuir para a adesividade do hidrogel (IQBAL; BABAR; ASHRAF, 2002; MAHNAJ; AHMED; PLAKOGIANNIS, 2013).

Muitos trabalhos correlacionam ainda o perfil reológico e viscosidade de semissólidos com potencial bioadesivo (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997). Neste sentido, a viscosidade do HP-NCSB também contribuiu na adesividade, visto que se caracterizou como a formulação mais consistente, corroborada pelo seu índice de consistência (K).

Por fim, cabe esclarecer que a membrana utilizada para esta avaliação foi pele de orelha de porco, diferente do tecido escolhido para o ensaio de permeação, o qual era pele humana. No entanto, como o objetivo desta análise era determinar se as formulações desenvolvidas utilizando Pemulen[®] TR2 apresentariam potencial bioadesivo frente a outro já conhecido polímero com esta característica e mais, se a nanoencapsulação iria contribuir nesta performance, a pele de orelha de porco atende de forma satisfatória a nossa investigação. Inclusive, muitos trabalhos utilizam este tecido para conduzir ensaios utilizando a mesma metodologia do presente estudo (FRADE et al., 2018; YOSHII, 2011).

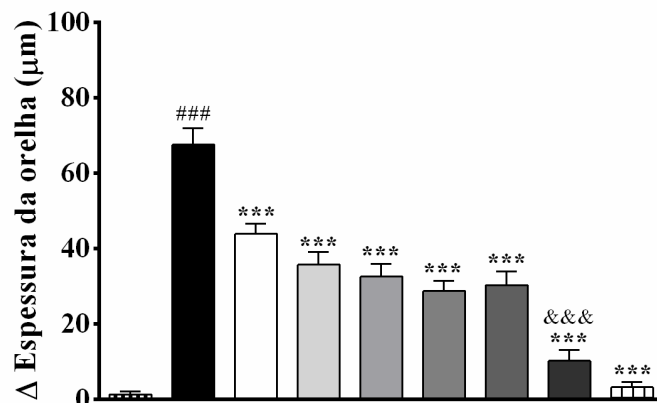
5.7 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON

O edema de orelha induzido por óleo de cróton (OC) foi utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória dos hidrogéis desenvolvidos. Seis horas após a sua aplicação, o OC aumentou a espessura da orelha dos animais com $E_{\text{máx}}$ de $68 \pm 4 \mu\text{m}$. Todos os hidrogéis testados foram capazes de reduzir efetivamente o edema de orelha com inibição máxima de $54 \pm 6 \%$, $57 \pm 4\%$, $51 \pm 5\%$, $46 \pm 5\%$ e $34 \pm 4 \%$ para HP-NCB, HP-SBOR, HP-OR, HP-SB e veículo, respectivamente. De modo especial, HP-NCSB foi capaz de reduzir o edema de orelha com inibição máxima de $85 \pm 4\%$, o qual foi similar ao efeito apresentado pelo controle positivo, dexametasona ($95 \pm 2\%$). Também foi observado que a nanoencapsulação aumentou o efeito anti-edematogênico da SB e OR, o qual pode ser evidenciado pelo HP-NCSB. Também foi observado que a presença da SB (HP- NCSB) aumentou o efeito do óleo de romã nanoencapsulado (figura 19).

Também foi verificada a capacidade dos hidrogéis em reduzir a infiltração de leucócitos no tecido injuriado. A aplicação tópica do OC na orelha dos camundongos foi capaz de induzir um aumento no número de células polimorfonucleares por campo na análise histológica (57 ± 3 células/campo) quando comparada ao grupo naïve (21

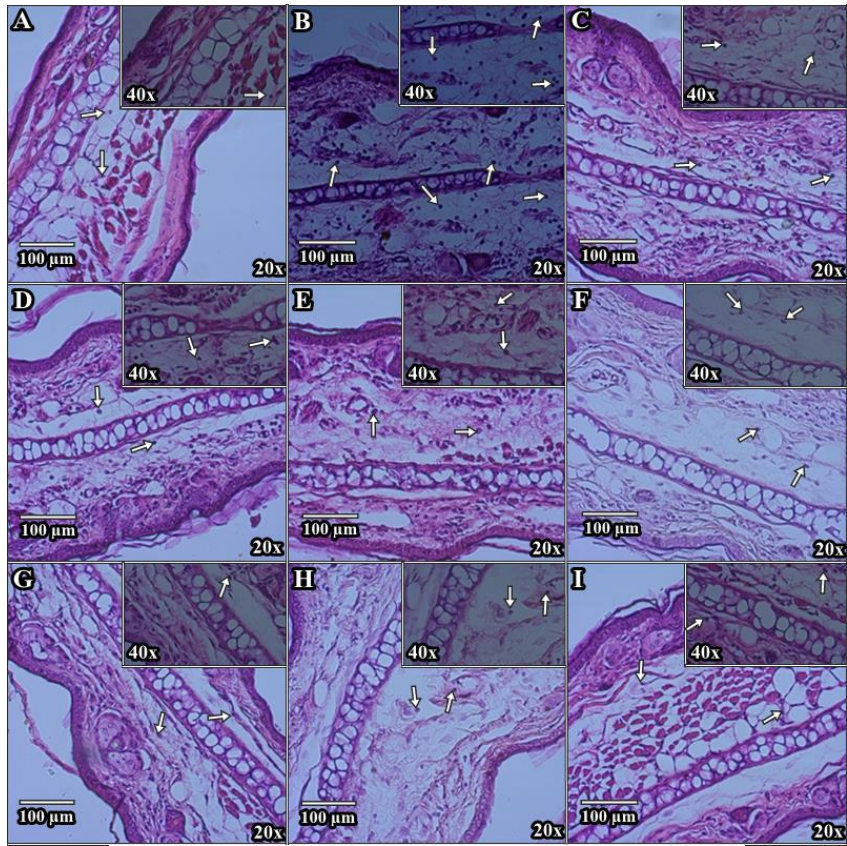
± 3 células inflamatórias/campo). Dentre os hidrogéis testados, os tratamentos tópicos apresentaram a capacidade de reduzir a infiltração de células inflamatórias (39 ± 5 , 28 ± 3 , 21 ± 3 células inflamatórias/campo para HP-SBOR, HP-NCB e HP-NCSB, respectivamente) quando comparado com o grupo não tratado (OC). Estes efeitos foram similares àqueles apresentados pelo controle positivo dexametasona (30 ± 2 células inflamatórias/campo) (figura 20).

Figura 19. Efeito antiedematogênico dos hidrogéis na inflamação cutânea induzida por OC em camundongos. Todas as formulações (15 mg/orelha) foram aplicadas imediatamente após a aplicação do OC. O edema da orelha foi medido 6 h após a administração do OC. Cada barra representa a média + SEM ($n = 6-8$); ### $p < 0,001$ mostra diferença significativa quando comparado ao grupo naíve. *** $p < 0,001$ mostra diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado (OC). &&& $p < 0,001$ mostra diferença significativa quando comparado com os grupos HP-NC SB e HP-NC B. ANOVA *one-way* seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

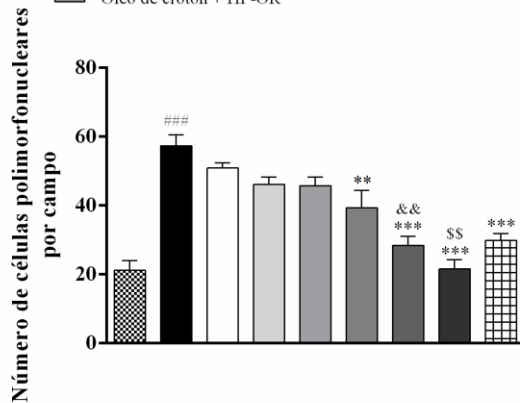


SB e OR são compostos de ocorrência natural que tem sido amplamente estudados em função de suas atividades biológicas, dentre elas atividade antioxidante e anti-inflamatória (GABRIELOVÁ et al., 2015; SURAI, 2015; BOROUSHAKI et al., 2016; LIN et al., 2017; MARCHIORI et al., 2017). Considerando que substâncias que possuem atividade antioxidante geralmente apresentam também atividade anti-inflamatória, nós investigamos o efeito anti-inflamatório de NC que continham como núcleo oleoso o óleo de romã e SB como ativo (KREN; WALTEROVÁ, 2005; ABDELAZIM, 2017).

Figura 20. Fotomicrografia de luz representativa da orelha (setas indicam as células polimorfonucleares) e quantificação de células polimorfonucleares por campo do tecido auricular de camundongos 6 h após a aplicação de OC ou OC mais tratamentos. Cada barra representa a média + SEM (n = 6–8); ### p<0,001 mostra diferença significativa quando comparado ao grupo naíve. ** p <0,01 e *** p <0,001 mostram diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado. && p <0,01 mostra diferença significativa quando comparado ao grupo HP-OR; \$\$ p <0,01 mostra diferença significativa quando comparado ao grupo HP-SB OR. A, B C, D, E, F, G, H, I indicam os grupos naíve, OC, OC tratados com o veículo, com HP-SB, com HP-OR, com HP-SBOR, com HP-NCB, com HP-NCSB e com dexametasona, respectivamente.



- ▨ Naíve
- Óleo de crôton (1 mg/orelha)
- Óleo de crôton + veículo
- ▤ Óleo de crôton + HP-SB
- ▥ Óleo de crôton + HP-OR
- ▧ Óleo de crôton + HP-SB OR
- ▨ Óleo de crôton + HP-NC B
- ▩ Óleo de crôton + HP-NC SB
- Óleo de crôton + dexametasona



Já é conhecido que o OC, pelo seu principal constituinte TPA, é capaz de induzir experimentalmente inflamação de pele em roedores, evidenciada por eritema, edema e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (STANLEY et al., 1991; BALD et al., 2016; PIANA et al., 2016). Este agente irritante tem sido empregado para induzir um processo inflamatório na orelha de camundongos e avaliar formulações semissólidas desenvolvidas quanto a sua performance em reduzir este dano inflamatório na pele de camundongos.

O edema é reconhecido como o primeiro sinal e um marcador de inflamação de pele, resultando primeiramente de permeabilidade vascular aumentada e proliferação de queratinócitos epidermais (MEDZHITOV, 2008; XU et al., 2016). Aqui, foi possível demonstrar que todos os hidrogéis testados reduziram o edema de orelha, um sinal de inflamação. HP-NCSB apresentou o efeito anti-edematogênico máximo dentre as formulações testadas, similar aquele apresentado pelo acetato de dexametasona, uma substância clinicamente utilizada para tratar doenças inflamatórias de pele.

Outra característica de inflamação de pele é a infiltração de leucócitos para o tecido danificado (STANLEY et al., 1991; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; XU et al., 2016). Foi observada por meio da análise histológica que as formulações HP-SBOR, HP-NCB e HP-NCSB reduziram a infiltração de células inflamatórias. Este resultado mostra a importância da associação dos compostos ativos e também da nanoencapsulação. A redução da infiltração de células inflamatórias é um importante efeito benéfico conferido por estas formulações, uma vez que a infiltração desordenada de células poderia conduzir a cronificação do processo inflamatório (NESTLE et al., 2009).

Em trabalho prévio desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que associou também em NC a SB e OR, incorporando em hidrogel de goma gelana, foi demonstrada a atividade anti-inflamatória empregando um modelo de inflamação de pele induzida a por radiação UVB (MARCHIORI et al., 2017). Os resultados positivos deste trabalho nos estimularam a dar continuidade a estudos empregando este nanossistema, porém propondo um hidrogel bioadesivo inovador como alternativa terapêutica a DCI, sendo importante mencionar que os resultados obtidos neste experimento *in vivo* estão de acordo com os obtidos por Marchiori e colaboradores (2017), reduzindo, portanto o edema e infiltração de células inflamatórias.

A atividade anti-inflamatória promovida pela SB e OR pode ser associada ao seu potencial inibitório sobre a via inflamatória do NFκB como previamente descrito (RAMASAMY, AGARWAL, 2008; KIM et al., 2013; KUMAR et al., 2015; MANDAL et al., 2017). NFκB é normalmente encontrado na forma inativa no citoplasma celular, ancorado a proteínas inibitórias da família IκB. Mediadores inflamatórios induzem a fosforilação e degradação do IκB, liberando o NFκB, que migra para o núcleo celular, ativando a transcrição de genes relacionados a resposta inflamatória, tais como síntese de citocinas e enzimas relacionadas a inflamação. Desta forma, a inibição deste fator poderia levar a efeitos anti-inflamatórios (TAK, FIRESTEIN, 2001; ISRAËL, 2010).

Desta forma, foi possível demonstrar ótima eficácia anti-inflamatória *in vivo* dos hidrogéis desenvolvidos contendo SB e OR. Dentre estas formulações, o hidrogel contendo SB e OR nanoencapsulados (HP-NCSB) mostrou ser o mais promissor, evidenciando o potencial anti-inflamatório da SB e a importância da associação destes compostos por meio de um possível sinergismo ocorrendo entre eles e reiterando a relevância da nanoencapsulação de fármacos, bem como a utilização de óleos vegetais com atividades biológicas intrínsecas como núcleo oleoso.

Ademais, os estudos de permeação e bioadesão realizados auxiliam também a entender o desempenho apresentado pelo hidrogel HP-NCSB *in vivo*. Esta formulação, permite que a SB fique retida significativamente mais no estrato córneo, podendo ser liberada gradualmente para a epiderme e assim sucessivamente, e desta forma pode-se obter um tratamento para DCI mais eficaz, pois a liberação de mediadores inflamatórios se dá a partir das células epidérmicas, bem como a expressiva biodesividade constatada para este hidrogel auxilia no seu efeito terapêutico esperado na área a ser tratada.

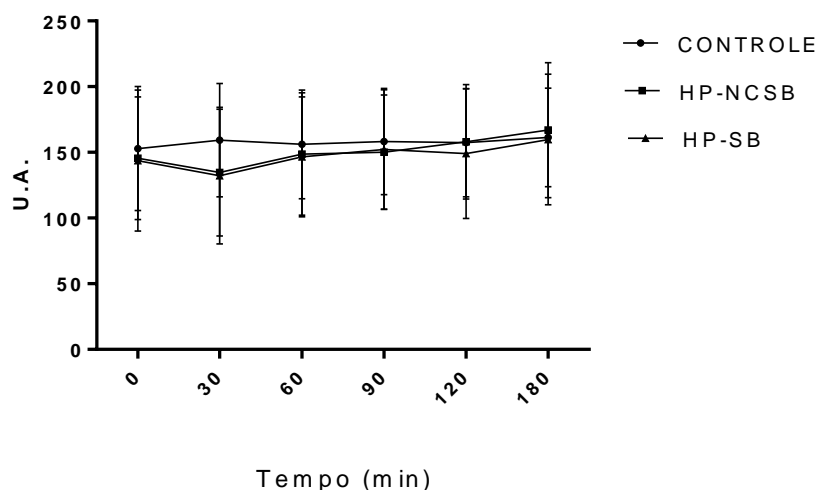
5.8 BIOMETRIA CUTÂNEA

A fim de avaliar a performance das formulações desenvolvidas nas condições reais de aplicação, contando assim com a participação de voluntários, estudos de biometria cutânea foram conduzidos. Estas avaliações são muito empregadas na área dermatocósmica, pois fazem uso de instrumentos não invasivos, úteis não somente para avaliar alterações na pele em decorrência de alguma patologia, como também

para avaliar a segurança e eficácia de produtos de uso tópico (GONÇALVES E CAMPOS, 2009; NARBUT et al., 2016; ZHAI et al., 2000).

Segundo a ANVISA, quando um produto de uso cutâneo torna-se disponível para o consumidor, é imprescindível que avaliações de segurança tenham sido conduzidas. Neste sentido, além de outras avaliações, reações de irritação cutânea na área de contato com o produto são extremamente úteis e importantes. Através da sonda Mexameter[®], verificou-se que ambas as formulações (HP-NCSB e HP-SB) não estimularam uma resposta inflamatória na pele, que poderia ter sido observada caso alguma substância fosse irritante ao tecido, por meio de um aumento na circulação sanguínea no local que seria detectada pela sonda (Figura 21). Este dado torna-se ainda mais relevante, pois esta sonda é bastante sensível, consegue detectar satisfatoriamente pequenas variações na coloração tecidual, sendo um dos equipamentos mais utilizados atualmente para determinar eritema e também melanina (CLARYS et al., 2000; PARK et al., 2006). Ademais, segundo a Convenção da Farmacopeia dos Estados Unidos (2014), a SB quando em contato direto com a pele apresenta potencial irritante, sendo recomendado portanto o uso de luvas adequadas para o seu manuseio e em caso de exposição a lavagem abundante do local. O Mexameter[®] baseia-se no princípio de espectrofotometria e para realizar a medida correspondente ao eritema da pele,) utiliza-se o comprimento de onda específico correspondente ao pico de absorção espectral da hemoglobina, evitando a interferência de outros pigmentos cutâneos (COURAGE-KHAZAKA, 2018).

Figura 21. Representação gráfica do eritema cutâneo (média \pm desvio padrão, n= 15, ANOVA de medida repetida seguida pelo pós-teste de *Tukey*).



Outro parâmetro biométrico avaliado foi a função barreira exercida pelo estrato córneo, que através da camada lipídica existente, previne a perda excessiva de água, garantindo assim uma condição saudável ao tecido. Esta característica foi observada pela sonda Tewameter[®], que mede a taxa de evaporação de água através de sensores de temperatura e umidade dentro da sonda, na qual através das medições concluiu-se que uma desorganização desta barreira não aconteceu, pois não houve variação estatística de nenhuma das formulações aplicadas frente seu respectivo controle (figura 22). O parâmetro da hidratação cutânea também foi determinado, com auxílio da sonda Corneometer[®], que funciona baseada no efeito capacitivo, e novamente nenhuma das formulações em estudo modificou este parâmetro ao longo do tempo (figura 23). Este dispositivo é utilizado mundialmente e permite avaliar a hidratação a uma profundidade de 30 μm . Assim, é possível perceber que há uma relação de proporcionalidade entre a hidratação cutânea a perda de água transepidermal e que a manutenção da hidratação cutânea promove a elasticidade e flexibilidade, o que é fundamental para estabilidade e resistência da epiderme (BLAAK et al., 2017; ROSADO et al., 2009; COURAGE-KHAZAKA, 2018; MELO; CAMPOS, 2016).

Da mesma forma que os parâmetros acima relatados, o pH, medido pela sonda Skin-pHmeter[®], não foi alterado, por nenhuma das formulações durante o tempo experimental estabelecido (figura 24). O pH da pele auxilia na manutenção da integridade do estrato córneo, coesão e restauração. Por exemplo, a contínua descamação de corneócitos depende da atividade de serina proteases, as quais necessitam de um pH ótimo (fisiológico, levemente ácido) para desempenhar seu papel. Ademais, a manutenção do pH adequado, tem função antimicrobiana, contribuindo assim para a funcionalidade do tecido (BLAAK et al., 2017; EBERLEIN-KÖNIG et al., 2000; DUARTE, 2013).

Figura 22. Representação gráfica da perda transepidermal de água (média \pm desvio padrão, n= 15, ANOVA de medida repetida seguida pelo pós-teste de *Tukey*).

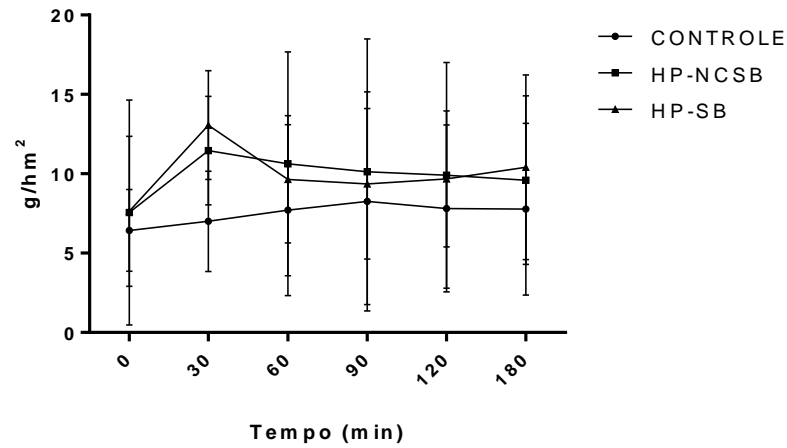


Figura 23. Representação gráfica indicando a variação no grau de hidratação cutânea (média \pm desvio padrão, n= 15, ANOVA de medida repetida seguida pelo pós-teste de *Tukey*).

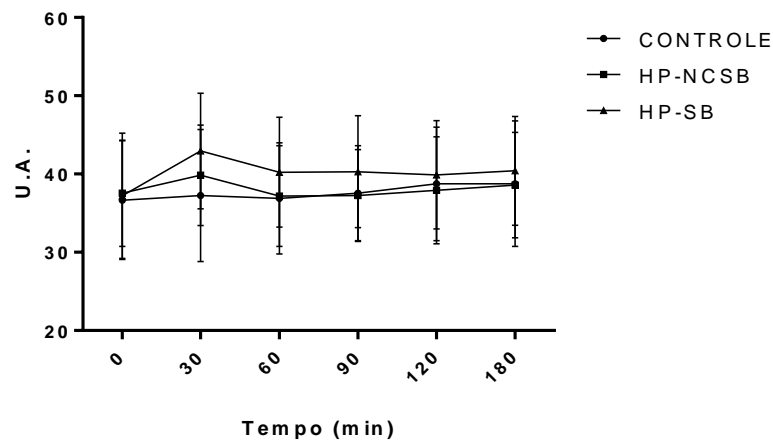
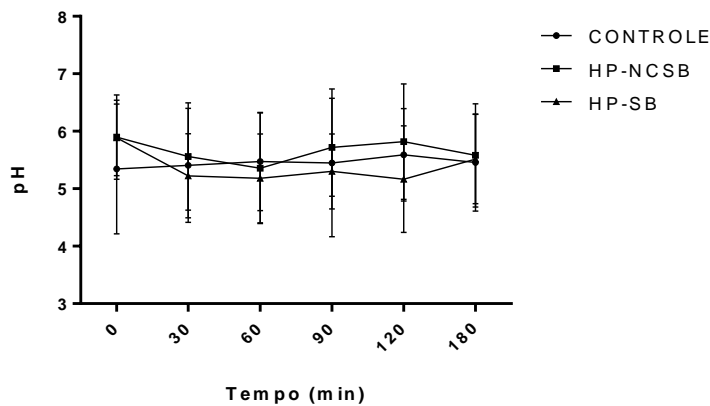


Figura 24. Representação gráfica referente ao pH cutâneo (média \pm desvio padrão, n= 15, ANOVA de medida repetida seguida pelo pós-teste de *Tukey*).



Em conjunto, todos estes aspectos cutâneos estudados são capazes de prever que as formulações propostas para o tratamento de doenças inflamatórias de pele, como a DCI, nas quais estes parâmetros muitas vezes são alterados, garantiram a manutenção das condições normais da pele e não demonstraram potencial irritante, indicando que as matérias-primas de escolha para o desenvolvimento das formulações, desde os componentes da preparação das NC, até os ingredientes selecionados para o desenvolvimento dos semissólidos, são adequados e mantêm a integridade da pele. Esse achado foi corroborado pela análise sensorial através dos questionários aplicados (anexo C), pois foi possível concluir através da percepção dos voluntários frente a algum desconforto que, ao final do experimento, não foram detectadas anormalidades.

6. CONCLUSÃO

Considerando o conjunto de resultados, nossos achados indicam que o hidrogel contendo nanocápsulas de silibinina foi desenvolvido com sucesso, utilizando o Pemulen[®] TR2 como agente formador de gel. Os dados de espalhabilidade e reologia demonstraram que a formulação proporciona uma aplicação uniforme sobre a pele. Além disso, a nanoencapsulação da silibinina proporcionou uma maior retenção no estrato córneo e se destacou frente às demais formulações no potencial bioadesivo. No modelo animal de dermatite de contato irritativa apresentou resultado similar ao da dexametasona, corticoide empregado no tratamento desta doença cutânea. Na avaliação em humanos, a formulação não provocou alterações nos parâmetros biométricos estudados, sendo considerada compatível com a pele. Desta forma, o hidrogel contendo nanocápsulas de silibinina pode ser considerado uma alternativa promissora para o tratamento da dermatite de contato irritativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELAZIM, S. A. A. Effect of silymarin as natural antioxidants and antimicrobial activity. **Nutrition & Food Science International Journal**, v. 2, p. 001-006, 2017.
- AGARWAL, C. et al. 2003. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. **Oncogene**, v. 22, p. 8271–8282, 2003.
- AHMAD, U. et al. Silymarin: an insight to its formulation and analytical prospects. **Acta Physiol Plant**, v. 37, n. 253, p. 1-17, 2015.
- ALCHORNE, A. O. A.; ALCHORNE, M. M.A.; SILVA, M. M. Occupational dermatoses. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p.:137-47, 2010.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. **Formas farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2013.
- ALVES. M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. 2006. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.
- ANDRADE, D. F.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R. Evaluation of three synthetic membranes as limiting barrier for in vitro drug release studies from hydrogelscontaining polymeric nanocapsules. **Current Nanoscience**, v. 10, p. 367-373, 2014.
- ANGELI, V. W. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. 2007. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2016.
- BALD, T. et al. Phorbol ester-induced neutrophilic inflammatory responses selectively promote metastatic spread of melanoma in a TLR4-dependent manner. **Oncoimmunology**, v. 5, p. 1-10, 2016.
- BALZUS, B. et al. Formulation and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p.122–130, 2017.

BÁNVÖLGYI, A.; et al. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. **Journal of Neuroimmunology**, v. 169, p. 86 – 96, 2005.

BEBER. T. C. et al. Cationic polymeric nanocapsules as a strategy to target dexamethasone to viable epidermis: skin penetration and permeation studies. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v. 16, p.1331–1338, 2016.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Editors. **Nanocosmetics and Nanomedicine – new approaches for skin care**. Springer: Berlin, 2011.

BERARDESCA, E. et al. Combined effects of silymarin and methylsulfonylmethane in the management of rosacea: clinical and instrumental evaluation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.7, n. 1, p. 8-14, 2008.

BEKIR, J. et al. Assessments of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 470 – 475, 2013.

BLAAK, J. D. et al. A plant oil-containing pH 4 emulsion improves epidermal barrier structure and enhances ceramide levels in aged skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, p. 284–291, 2017.

BORGHETTI, G. S., KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1- 7, 2006.

BOROUSHAKI M. T.; Mollazadeh, H.; Afshari, A. R. Pomegranate seed oil: A comprehensive review on its therapeutic effects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, p. 430–442, 2016.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241–251, 2004.

BOUWSTRA, J. A; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 41 – 55, 2002.

BRUM, T. F. et al. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 60-67, 2016.

BRUSCHI, M. **Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno: avaliação da estabilidade e permeação cutânea**. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, 2010.

CAMPOS, P. M.; F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, Electrochemical and evaporative light scattering detectors. **Journal of Chromatography B**, v. 15, p. 66-71, 2016.

CAO, X. et al. Seventy-two-hour release formulation of the poorly soluble drug silybin based on porous silica nanoparticles: In vitro release kinetics and in vitro/in vivo correlations in beagle dogs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 64–71, 2013.

CARINI, R.; COMOGLIO, A.; ALBANO, E.; POLI, G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n. 10, p. 2111-2115, 1992.

CARVALHO, F. C., CHORILLI, M., GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco)adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos – propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v.24, n. 2, p.203-213, 2014.

CHAVES, P. S. et al. Mucoadhesive properties of Eudragit® RS100, Eudragit® S100, and Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules: influence of the vehicle and the mucosal surface. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1637-1646, 2018.

CHÁVEZ, G. E, ESTRADA, R., C, CHÁVEZ, G. L, ARMENDÁRIZ, F. G. V. Estudio preliminar de la prescripción indiscriminada de corticoesteroides tópicos en medicina general. **Dermatologia Revista Mexicana**, v. 57, p. 433-437, 2013.

CHOI, Y. H. et al. Silibinin attenuates allergic airway inflammation in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 427, p. 450–455, 2012.

CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 3, p. 237-246, 2006.

CLARYS, P., ALEWAETERS, K., LAMBRECHT, R., BAREL, A. O. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter. **Skin Research and Technology**, v. 6, p. 230–238, 2000.

COLIPA. **Cosmetic Ingredients: Guidelines for Percutaneous Absorption/Penetration**. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association. 2^a ed., 1997.

CONTRI, R. V.; FRANK, L. A.; KAISER, M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES, S. S. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 951–962, 2014.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

Courage-Khazaka-Scientific-Devices (2018). Alemanha, 2018. Disponível em: <<https://www.courage-khazaka.de>> Acesso em: 16 fev. 2018.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CUNHA, M. G. CUNHA, A. L. G.; MACHADO, C.A. Hipoderme e tecido adiposo subcutâneo: duas estruturas diferentes. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 6, p. 355-359, 2014.

DA SILVA, C. D. **Combretum leprosum Mart. (Combretaceae) – Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos**. 2009. 97 p. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

DA SILVEIRA E. F. et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, v. 31, p. 1424 - 1435, 2013.

DALLA POZZA, C. C. **Tabernaemontana catharinensis apresenta atividade anti-inflamatória tópica em modelos de dermatite de contato irritativa em camundongos**. 2017. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: bioquímica toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

DAS, S.; et al. Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1291–1301, 2011.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; GUERREIRO, I. C. K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v.65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DE LIMA, J. A. **Desenvolvimento de hidrogéis mucoadesivos contendo nanocápsulas catiônicas de clotrimazol para o tratamento de candidíase vulvovaginal**. 2015. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

DE SANTIS, A. K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica**. 2008. 157 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

DIAS, S.; FIGUEIRAS, A.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; VEIGA, F. A administração na mucosa bucal como uma estratégia alternativa à via oral. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, n. 4, p.118-133, 2007.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

EBERLEIN-KOË N. et al. Skin Surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. **Acta Dermato Venereologica**. 80,188-191, 2000.

EL-SAMALIGY, M. S.; AFIFI, N. N; MAHMOUD, E. A. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 319, p. 121–129, 2006.

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS. **United States Pharmacopeial Convention (USP) – Safety data sheet**. Estados Unidos da América, 2014.

FEDERICO, A.; DALLIO, M; LOGUERCIO, C. Silymarin/Silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. **Molecules**, v., 22, p. 191-206, 2017.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3ª ed. Pharmabooks: São Paulo, 2008.

FERREIRA, B. I. A. L. S. et al. Dermatites: diagnóstico e terapêutica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 5, n.2, p.22-26, 2014.

FERREIRA, L. M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal antiinflammatory drug. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 214-221, 2016.

FONTANA, M. C. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 254–263, 2009.

FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241–249, 2011.

FRADE M. L. et al. Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. **Molecules**, v. 23, p. 473-489, 2018

FRIEDRICH, R.B. et al. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 204-213, 2015.

FRANK, L. A. et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p. 3151–3161, 2014.

FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology**, v. 7, p. 623–639, 2015.

FRANK, L. A. et al. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 114, p. 202–212, 2017.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, 64, 3,190-195, 1975.

GABRIELOVÁ, E. et al. Silymarin component 2,3-dehydrosilybin attenuates cardiomyocyte damage following hypoxia/reoxygenation by limiting oxidative stress. **Physiological Research**, v. 64, p. 79-91, 2015.

GARG, A. et al. Spreading of semisolid formulations - an update. **Pharmaceutical Technology**, 2002.

GAZAK, R.; WALTEROVÁ, D.; KREN, V. Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 315-338, 2007.

GIBBS, S. In vitro irritation models and immune reactions. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p.103–113, 2009.

GODIN, B., TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

GOHULKUMAR, M. et al. Enhanced cytotoxicity and apoptosis-induced anticancer effect of silibinin-loaded nanoparticles in oral carcinoma (KB) cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 41, p. 274–282, 2014.

GONÇALVES, G. M. S, CAMPOS, P. M. B., Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 45, p. 1-10, 2009.

GREEN, J.; KALISCH, A. Milk thistle (*Silybum marianum*). **Cam-cancer consortium**, p.1-8, 2013.

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

HAGEN, M.; BAKER, M. Skin penetration and tissue permeation after topical administration of diclofenac. **Current Medical Research and Opinion**, v. 33, n. 9, p.1623–1634, 2017.

HAN et al. Contact dermatitis: Allergic and irritant. **Clinics in Dermatology**, v. 32, p. 116–124, 2014.

HAN, L. et al. Effects of silibinin-loaded thermosensitive liposome-microbubble complex on inhibiting rabbit liver VX2 tumors in sub-hyperthermia field. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, p. 1233-1240, 2018.

HERKENNE, C. et al. Ibuprofen Transport into and through skin from topical formulations: in vitro – in vivo comparison. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 135–142, 2007.

HORA, J. J.; MAYDEW, E. R.; LANSKY, E. P.; DWIVEDI, C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n.3, p. 157-161, 2003.

HUANG, X. et al. Polyamidoamine dendrimers as potential drug carriers for enhanced aqueous solubility and oral bioavailability of silybin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 4, p. 419–427, 2011.

ISRAËL, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-14, 2010.

IQBAL, Z.; BABAR, A.; ASHRAF, M. Controlled-release naproxen using micronized Ethyl Cellulose by wet-granulation and solid-dispersion method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n.2, p. 129–134, 2002.

IQBAL, B. et al. Recent advances and development in epidermal and dermal drugdeposition enhancement technology. **International Journal of Dermatology**, v. 57, p. 646-660, 2018.

JENNING, V. et al. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, n. 3, p. 211–218, 2000.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 450-45, 1997.

KAUR, A. et al. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. **Nanomedicine: NBM**, v. 13, p. 1473–1482, 2017.

KIM, J. et al. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, n. 7, p. 614–623, 2003.

KIM, B. R. et al. Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells. **Inflammation Research**, v. 62, n. 11, p. 941-950, 2013.

KŘEN, V.; WALTEROVÁ, D. Silybin and Silymarin - new effects and applications. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 29-41, 2005.

KHAN, P. A.; THUBE, R.; RAB, R. A. Formulation development and evaluation of silymarin gel for psoriasis treatment. **Journal of Innovations in Pharmaceutics and Biological Sciences**, v. 1, p. 21-26, 2014.

KOSTNER, L. et al. Allergic Contact Dermatitis. **Immunol Allergy Clin**, v. 37, p. 141–152, 2017.

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p.99–121, 2002.

KREN, W.; WALTEROVÁ, D. Silybin and Silymarin – new effect and applications. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 29–41, 2005.

KU, H. et al. Gene expression profiles and pathways in skin inflammation induced by three different sensitizers and an irritant. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 231–237, 2009.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C. et al. Development and stability of innovative semisolid formulations containing nanoencapsulated lipoic acid for topical use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p.7723–7732, 2012

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2005.

KUMAR, R.; DEEP, G.; AGARWAL, R. An overview of ultraviolet B radiation-induced skin cancer chemoprevention by silibinin. **Current Pharmacology Reports**, v. 1, p. 206-215, 2015.

LACHAPELLE, J. M. et al. Best practices, new perspectives and the perfect emollient: optimizing the management of contact dermatitis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 29, n. 3, p. 241-251, 2017.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, p. 12– 21, 2013.

LAZZARINI, R.; FREITAS, T. H. P.; OLIVEIRA, L. B. Furoato de mometasona: sua importante ação na inibição das citocinas inflamatórias. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 60, n. 5, p. 293-298, 2003.

LÁZARO, A. GARCIA, M. Corticosteroides tópicos. **Informacion terapêutica del Sistema Nacional de Salud**, v. 34, n. 3, 2010.

LEE, H. Y.; Stieger, M., Yawalkar, N.; Kakeda, M. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

LEITE, G. O. **Atividade antiinflamatória tópica e antinociceptiva visceral do óleo essencial do caule de *Vanillosmopsis arborea baker* e do seu principal constituinte, (-)- α -bisabolol**. 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, 2011.

LIM, R.; MORWOOD, C. J; BARKER, G.; LAPPAS, M. Effect of silibinin in reducing inflammatory pathways in in vitro and in vivo models of infection-induced preterm birth. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-13, 2014.

LIMA, J. A. et al. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. **Material Science and Engineering: C**, v.79, p. 886-893, 2017.

LIN, T-K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J. L. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(1):70, 2017.

LINO, F. G. **Efeitos da silimarina e da silibinina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni***. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2012.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LISBY, S.; BAADSGAARD, O. Mechanisms of irritant contact dermatitis. In: Frosch P.; Torkil, M. Lepoittevin, J. P. **Contact Dermatitis**. 4 ed: Berlim: 2010, cap. 4, p. 69-82.

LIU, W. LI, Y., ZHENG, X., ZHANG, K., DU, Z. Potent inhibitory effect of silibinin from milk thistle on skin inflammation stimuli by 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate. **Food & Function**, v. 6, p. 3712-3719, 2015.

LUBRIZOL. **Skin Care Products Formulated with Pemulen® Polymeric Emulsifiers**. Ohio, 2007. Disponível em: <<https://www.lubrizol.com/Skin-Care-Products-Formulated>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

MADY, F. M.; ESSA, H.; EL-AMMAWI, T.; ABDELKADER, H.; HUSSEIN, A. K. Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatites. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1101–1110, 2016.

MAHNAJ, T.; AHMED S. U.; PLAKOGIANNIS, F. M. Characterization of ethyl cellulose polymer. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 5, p. 982–989, 2013.

MALLIKARJUNA, G. et al. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and akt signaling. **Cancer Research**, v. 64, p. 6349–6356, 2004.

MANSURI, S. et al. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151–172, 2016.

MARCHIORI, M. C. L. et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 962-971, 2010.

MARCHIORI, M. C. L.; RIGON, C.; CAMPONOGARA, C. OLIVEIRA, S. M. CRUZ, L. Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v, 170, p. 25–32, 2017b.

MARCHIORI, M. C. L et al. Nanoencapsulation improves scavenging capacity and decreases cytotoxicity of silibinin and pomegranate oil association. **AAPS PharmSciTech**, p. 1-11, 2017a.

MARTINS, M. R. F.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 32-54, 2002.

MARTO, J. et al. Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 1–11, 2018.

MANDAL, A.; BHATIA, D.; BISHAYEE, A. Anti-inflammatory mechanism involved in pomegranate-mediated prevention of breast cancer: the role of NF- κ B and Nrf2 signaling pathways. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 1-13, 2017.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism – State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 879–886, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MEIRA, A. S. **Estudos de permeação/retenção cutânea in vitro empregando pele suína para comparação de desempenho de formulações semi-sólidas dermatológicas**. 2010. 45 p. Trabalho de Conclusão da Disciplina (Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2010.

MELERO, A. et al. Nanoencapsulation in lipid-core nanocapsules controls mometasone furoate skin permeability rate and its penetration to the deeper skin layers. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 217–228, 2014.

MELO, M. O.; CAMPOS, P. M. Função de Barreira da Pele e pH Cutâneo. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 28, p. 34-38, 2016.

MENDONÇA, C. C. et al. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 35-46, 2009.

MILESI S.S.; GUTERRES, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 81 – 87, 2002.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules

for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORAZZONI, P., MAGISTREITI, M. J., GIACHEITI, C. ZANOLO, G. Comparative bioavailability of Silipide, a new flavanolignan complex, in rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.17, p. 39-44, 1992

MOTTA, A. A.; AUN, M. V.; KALIL, J.; BIANCHI, P. G. Dermatite de contato. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 34. n. 3, p. 73-82, 2011.

NARBUTT, J., BEDNARSKI, I. A., LESIAK, A. The effect of an emollient with benfothiamine and Biolin prebiotic on the improvement of epidermal skin function. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 3, p. 224–231, 2016.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-691, 2009.

NONNENMACHER, J. L.; MIKULSKI, B. S.; ROMAN, S. S. Anti-inflammatory activity of the essential oil and hydroalcoholic extract of *Ruta graveolens* L. (Rue) on ear edema in mice. **Perspectiva**, v. 41, n.153, p. 125-134, 2016.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Skin Absorption: *in vitro* Method**. Paris. 2004

OLIVEIRA, S. M. et al. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 124C, p. 396-404, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Environmental Health Criteria 235 Dermal Absorption**. Suíça. 2006.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5 (5), p. 661-674, 2013.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1–4, 2008.

OURIQUE A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95–101, 2011.

PARENTE, M. E. et al. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 511-518, 2015.

PARK, E. S. et al. Application of a pigment measuring device – Mexameter – for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. **Skin Research and Technology**, v. 12, p. 298–302, 2016

PEGORARO, N.S. et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 32–40, 2017.

PEPPAS, N. A.; BURI, P. A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. **Journal of Controlled Release**, v. 2, p. 257-275, 1985.

PERIOLI, L. et al. Rheological and functional characterization of new antiinflammatory delivery systems designed for buccal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 19–28, 2008.

PIANA, M. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 16-21, 2016.

PIOTROWSKI, M.; JANTAS, D.; SZCZEPANOWICZ, K.; ŁUKASIEWICZ, S.; LASON, W.; WARSZYNSKI, P. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing undecylenic acid: Synthesis, biocompatibility and neuroprotective properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 8–17, 2015.

PLANZ, V.; LEHR, C. M.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89–104, 2016.

PRAÇA, F. S. G. et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2017.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p.623-638.

POOJA, D., et al. Fabrication, characterization and bioevaluation of silibinin loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 267–273, 2014.

PRAPHANWITTAYA, P.; CHOMTO, P.; PHAECHAMUD, T. Silymarin Solid Lipid Nanoparticle containing Shellac Wax Fabricated with Hot Melt Emulsification. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, p. 784- 801, 2013.

QIU, H.; MCCALL, J. W.; WON JUN, H. Formulation of topical insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 167–176, 1998.

RADHAKRISHNAN, K.; THOMAS, M. B.; PULAKKAT, S.; GNANADHAS, D. P.; CHAKRAVORTTY, D.; RAICHUR, A. M. Stimuli-responsive protamine-based biodegradable nanocapsules for enhanced bioavailability and intracellular delivery of anticancer agents. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 341, p. 1-12, 2015.

RAMASAMY, K.; AGARWAL, R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. **Cancer Letters**, v. 269, p. 352–362 2008.

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.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. Pharmabooks: São Paulo, 2010.

RIGBY, C. M. et al. Role of p53 in silibinin-mediated inhibition of ultraviolet B radiation-induced DNA damage, inflammation and skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 38, p. 40-50, 2017.

RIGO, L. A. et al. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 1387-1391, 2012.

RIGO, L. A. et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB-radiation induced skin injury in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p.11-17, 2015.

ROSADO, C. et al. Acerca da Medição da Hidratação “profunda” da Pele. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 6, p. 65-75, 2009.

SAVIC, S., MILIC, J., VULETA, G., PRIMORAC, M. Physical characteristics of o/w emulsions based on acrylate polymeric emulsifiers or combination polymeric emulsifier/non-ionic emulsifier. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 12, p. 321–327, 2002.

SARI, M. H. M. et al. Biochemical and histological evaluations of anti-inflammatory and antioxidant p-chloro-selenosteroid actions in acute murine models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 781, p. 25–35, 2016.

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

SADIQ, A. A.; RASSOL, A. A. Formulation and evaluation of silibinin loaded solid lipid nanoparticles for peroral use targeting lower part of gastrointestinal tract. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 55-67, 2014.

SCHROETER, A.; ENGELBRECHT, T.; NEUBERT, R. H. H.; GOEBEL, A. S. B. New nanosized technologies for dermal and transdermal drug delivery. A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 511–528, 2010.

SEYFARTH, F.; SCHLIEMANN, S.; ANTONOV, D.; ELSNER, P. Dry skin, barrier function, and irritant contact dermatitis in the elderly. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 31–36, 2011.

SHARIFI, R. et al. Effect of topical application of silymarin (*Silybum marianum*) on excision wound healing in albino rats. **Acta Medica Iranica**, v. 50, n. 9, p.583-588, 2012.

SHAH,V. P.; ELKINS,J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 3, p. 377–385, 1999.

SHAWESH, A. M. et al. Development of indomethacin Carbopol ETD 2001 gels and the influence of storage time and temperature on their stability. **Pharmazie**, v. 58, p. 130–135, 2003.

SHROTRIYA, S. N.; VIDHATE, B. V.; SHUKLA, M. S. Formulation and development of Silybin loaded solid lipid nanoparticle enriched gel for irritant contact dermatites. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 164-173, 2017.

SILVA, G. L. et al. P2X7 receptor is required for neutrophil Accumulation in a mouse model of irritant contact dermatites. **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 184–188, 2013.

SINGH, R.; AGARWAL, R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 969–1979, 2005.

SINGH, P.; SINGH, M.; KANOJIA, J.; ARYA, M.; SARAF, S. K.; SARAF, A. A. Process optimization and photostability of silymarin nanostructured lipid carriers: effect on UV-irradiated rat skin and SK-MEL 2 cell line. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, p.597–609, 2016.

SHAHIN, M. et al. Optimized formulation for topical administration of clotrimazole using Pemulen polymeric emulsifier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.37, n.5, p. 559–568, 2011.

SHIROMA, P. H. **Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de Bentonita e CMC: influência da concentração de NaCl**. 2012. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

SLODOWNIK, D.; LEE, A.; NIXON, R. Irritant contact dermatitis: A review. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 49, p. 1–11, 2008.

SPELLBERG, D. The cutaneous citadel: A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v.67, p. 477-502, 2000.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

SURAI, P. F. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. **Antioxidants**, v. 4, p. 204-247, 2015.

SUHONEN, T. M.; BOUWSTRA, J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 149–161, 1999.

SYED, D. N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, p. 377 – 385, 2007.

SZÚCS, M., SANDRI, G., BONFERONI, M. C., CAMELLAB, C. M., VAGHI, P., SZABÓ-RÉVÉSZ, P., ERÓS, I. Mucoadhesive behaviour of emulsions containing polymeric emulsifier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 226–235, 2008.

TANOJO, H. et al. New design of a flow-through permeation cell for studying in vitro permeation studies across biological membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 45, p. 41-47, 1997.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107 (1), p. 7-11, 2001.

TING, W. W.; VEST, C. D.; SONTHEIMER, R. D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. **International Journal of Dermatology**, v. 4, p. 538–547, 2004.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 106–121, 2006.

VAID, M. et al. Silymarin inhibits melanoma cell growth both in vitro and in vivo by targeting cell cycle regulators, angiogenic biomarkers and induction of apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, p. 1328-1339, 2015.

VARGAS P. N. et al. Formulações semissólidas contendo meloxicam nanoencapsulado: estudos de liberação “*in vitro*”. **Disciplinarum Scientia**, v. 14, n. 1, p. 35-44, 2013.

VERMA, D. D. et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 141–151, 2003.

VILLANOVA, J. C. O. ORÉFICE, R. L., CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VOINOVICH D. et al. Solid state mechanochemical activation of *silybum marianum* dry extract with betacyclodextrins: characterization and bioavailability of the coground systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 4119–4129, 2009.

WEISS-ANGELLI, V. et al. Development of an original method to study drug release from polymeric nanocapsules in the skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 35–45, 2010.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity-in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 67-72, 2003.

XU, P. et al. Synergistic inhibition of breast cancer metastasis by silibinin-loaded lipid nanoparticles containing TPGS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 21– 30, 2013.

XU, X. T.; et al. Anti-inflammatory activity effect of 2-substituted-1,4,5,6-tetrahydrocyclopenta[*b*]pyrrole on TPA-induced skin inflammation in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26 (21), p. 5334-5339, 2016.

YOSHII, A. C. **Hidrogéis do ácido acrílico: correlação das propriedades bioadesivas e liberação *in vitro* do metronidazol**. 2011. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

ZACK, B. ARRANDALE, V., HOLNESS, D. L. Skin-specific training experience of workers assessed for contact dermatitis. **Occupational Medicine**, v. 68, p. 203-206, 2018.

ZHAI, H. et al. A bioengineering study on the efficacy of a skin protectant lotion in preventing SLS-induced dermatitis. **Skin ResearchTechnology**, v. 6, p. 77–80, 2000.

ZHANG, L.; TILKLE, S. S. Chemical activation of innate and specific immunity in contact dermatitis. **The Journal of Investigative dermatology**, v. 115, n. 2, p.168-176, 2000.

ZHENG, D.; et al. *In vitro* antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. **Cancer Letters**, v. 307, p. 158–164, 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

APÊNDICE A – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE



Termo de confidencialidade

Título do projeto: Desenvolvimento de formulações semissólidas de base nanotecnológica contendo ativos anti-inflamatórios e antitumorais para terapêutica ou profilaxia dos danos causados pela radiação ionizante na pele humana.

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Letícia Cruz

Instituição/Departamento: Departamento de Farmácia Industrial – Universidade Federal de Santa Maria

Telefone: (55) 3220 9373

Local da coleta de dados: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, prédio 26, sala 2133, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 - Santa Maria – RS.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos participantes desta pesquisa, cujos dados são anônimos, sendo conseqüentemente mantidos em sigilo. Informam, ainda, que estas informações serão utilizadas, única e exclusivamente, para execução do presente projeto.

As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na UFSM - Avenida Roraima, 1000, prédio 26, sala 2133 - 97105-900 - Santa Maria - RS por um período de cinco anos, sob a responsabilidade de Letícia Cruz. Após este período os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em/...../....., e recebeu o número Caae

Santa Maria,

Assinatura do pesquisador responsável.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do estudo: Desenvolvimento de formulações semissólidas de base nanotecnológica contendo ativos anti-inflamatórios e antitumorais para terapêutica ou profilaxia dos danos causados pela radiação ionizante na pele humana.

Pesquisador responsável: Letícia Cruz

Instituição/Departamento: Departamento de Farmácia Industrial/ Universidade Federal de Santa Maria

Telefone e endereço postal completo: (55) 3220 9373. Avenida Roraima, 1000, prédio 26, sala 2133 - 97105-900 - Santa Maria – RS.

Local da coleta de dados: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, prédio 26, sala 2133, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria – RS.

Eu, Letícia Cruz, responsável pela pesquisa “Desenvolvimento de formulações semissólidas de base nanotecnológica contendo ativos anti-inflamatórios e antitumorais para terapêutica ou profilaxia dos danos causados pela radiação ionizante na pele humana”, o convidamos a participar como voluntário deste estudo. Esta pesquisa pretende verificar alguns aspectos cutâneos ao administrar géis sobre a pele. Neste sentido, serão avaliados os géis contendo substâncias nanoencapsuladas e os géis contendo as substâncias não-nanoencapsuladas (ativos livres). Antes da aplicação das formulações em estudo, seu braço será lavado com sabão neutro, para então serem feitos círculos de tamanho padronizado em ambos os braços, sendo que em um dos círculos não será aplicada a formulação, configurando a área controle. Após este procedimento inicial as formulações serão aplicadas nas áreas delimitadas com auxílio de espátulas descartáveis em uma concentração a ser determinada no decorrer deste trabalho, ficando em contato com a sua pele por 30 min para, na sequência, serem removidos com lenços descartáveis e água corrente. Para verificar a presença de irritação na pele, uma sonda eletrônica (Mexameter®) será empregada. Além disso, as áreas de aplicação serão analisadas visualmente e o voluntário será questionado quanto à percepção de alguma irritação, bem como registros fotográficos das áreas onde foram aplicadas as formulações serão realizados. A fim de verificar o pH cutâneo e a perda transepidermal de água, sondas eletrônicas serão usadas (Skin-pH-Meter® e Tewameter®). Em todos os casos, as sondas eletrônicas correspondem a uma peça em formato de bastão que será encostada por alguns segundos na região de aplicação para obtenção das medidas. É importante esclarecer que a aproximação da sonda não desencadeia dor.

Sua participação constará em comparecer ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (UFSM) para que, com auxílio de espátulas descartáveis, as formulações sejam aplicadas nas áreas delimitadas, sendo garantido o sigilo da sua participação. Com relação aos desconfortos ou riscos, todos os componentes da

formulação são comumente utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas, disponíveis comercialmente e não apresentam potencial irritante sendo, portanto, considerados de baixo risco. Mesmo assim, é importante destacar que antes de iniciar a avaliação uma pequena quantidade será aplicada previamente para verificar a ocorrência de desconforto ou irritação na pele e que, caso ocorra, o experimento será interrompido e o voluntário será encaminhado imediatamente à assistência médica gratuita para o paciente.

Autorização

Eu,, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expressei minha concordância em participar deste estudo e assino este termo em duas vias, uma das quais foi-me entregue.

.....
Assinatura do voluntário

.....
Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Santa Maria,

APÊNDICE C – ESTUDO SENSORIAL PARA OS VOLUNTÁRIOS

VOLUNTÁRIO*: _____ IDADE: _____ anos HORÁRIO: _____

ESTUDO SENSORIAL – PARA VOLUNTÁRIOS

⇒ FORMULAÇÃO A

Marque se você percebeu alguma das sensações abaixo descritas:

30 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

60 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

90 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

120 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

180 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

⇒ FORMULAÇÃO B

Marque se você percebeu alguma das sensações abaixo descritas:

30 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

60 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

90 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

120 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

180 min:

O coceira O queimação O dor O outro (especificar)

*: sua identidade não será divulgada

APÊNDICE D – MANUSCRITO CIENTÍFICO

Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents anti-inflammatory action effective in a model of irritant contact dermatitis in mice

Cristina Rigon^a, Marila Crivellaro Lay Marchiori^a, Fernanda da Silva Jardim^a, Natháli Schopf Pegoraro^b, Paula dos Santos Chaves^c, Maiara Callegaro Velho^d, Ruy Carlos Ruver Beck^c, Aline Ferreira Ourique^d, Marcel Henrique Marcondes Sari^a, Sara Marchesan de Oliveira^b, Letícia Cruz^{a*}

^aLaboratório de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, Brazil;

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil;

^dPrograma de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, 97010-032, Brazil;

*Corresponding author:

Letícia Cruz

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, Brazil.

E-mail address: leticiacruz@smail.ufsm.br.

ABSTRACT

Silibinin have beneficial activities for skin tissue, such as photoprotection, antitumor and anti-inflammatory effects. In previous studies performed in our research group, pomegranate oil nanocapsules loaded with silibinin and applied topically were capable of modifying permeation, penetration and active retention phenomena. Thus, this study aimed to demonstrate the development of an innovative hydrogel for carrying pomegranate oil-based nanocapsules containing silibinin from the bioadhesive polymer Pemulen® TR2, as well as verifies the potential of the formulation for the treatment of the irritant contact dermatitis. Therefore, the hydrogels were evaluated for pH, silibinin content, particle size and polydispersity index, spreadability, rheology, *in vitro* release, cutaneous permeation (using human skin), bioadhesive potential and biometry study in volunteers. Furthermore, an *in vivo* study was conducted to verify the anti-inflammatory potential of hydrogels in a model of contact dermatitis croton oil-induced. The formulation presented adequate characteristics for administration to the skin, maintaining the nanometric size (184 ± 26 nm) after incorporation into the hydrogels, adequate pH range (slightly acid, $6,70 \pm 0,15$), silibinin concentration close to 1 mg/g, as well as non-Newtonian pseudoplastic behavior. Hydrogels containing the nanocapsules provided less retention of the silibinin in the pharmaceutical dosage form in the *in vitro* release test. Permeation studies on human skin have indicated that the silibinin nanoencapsulation increase its retention in the *stratum corneum*, which can act as a deposit for gradual release of this active. In the *in vivo* study, the semisolids containing the silibinin nanocapsules reduced the ear edema and infiltration of inflammatory cells (inhibition of $85 \pm 4\%$). In the cutaneous biometrics test, for all the parameters tested, the formulations did not alter the normal skin conditions of the volunteers. Therefore, based on the results obtained, the development of hydrogel was successful and indicates that this is a promising alternative for the treatment of irritant contact dermatitis since the hydrogel containing silibinin nanocapsules had satisfactory results against the hydrogel containing non-associated silibinin, as well as the contribution of Pemulen® TR2 to the performance of the formulations.

Keywords: silymarin, dermatitis, nanoparticles, semisolids, cutaneous.

1.INTRODUCTION

Nanocapsules (NC) have been studied as carriers of active substances of synthetic or natural origin for topical use. They can be defined as vesicular structures, containing generally an oily core surrounded by a polymeric membrane (Mora-Huertas et al., 2010). These nanostructures are obtained as liquid suspensions which complicates its residence on the cutaneous tissue. To circumvent this aspect, recent studies have shown the incorporation of NC into hydrogels (Ourique et al., 2011, Kùlkamp-Guerreiro et al., 2012; Pegoraro et al., 2017). Nanocarriers can contribute to the modulation of processes such as permeation/penetration/retention of the skin's actives, which is closely related to its size and structure (Alves et al., 2007; Mora-Huertas et al., 2010; Beck et al., 2011; Balzus et al., 2017).

The skin tissue is the interface between the external environment and the internal environment of our organism and is composed of a complex structure with multiple cell types. Because of this exposure, the skin is affected by different changes and therefore is a frequent therapeutic target. Dermatological disorders of inflammatory origin represent a fairly common category of skin diseases, including contact dermatitis, currently one of the most reported occupational diseases in clinical practice (Zack et al., 2018). Contact dermatitis is characterized as eczematous lesions caused by exogenous agents that may be sensitizing or irritating, thus subdividing into allergic and irritant contact dermatitis, respectively. Irritant contact dermatitis is the most prevalent skin inflammatory disorder, triggered by innate immunity after direct contact of an irritant with the skin (Motta et al., 2011; Kostner et al., 2017).

The drug therapy for contact dermatitis is usually focused on the use of topical corticosteroids (Chávez et al., 2013; Ferreira et al., 2014). However, although they are of considerable importance in controlling inflammation, corticosteroids have relevant adverse effects, such as rosacea, stretch marks and immunological changes, related to the region of the body involved, potency and time of administration, often neglected (Lázaro and Garcia, 2010; Chávez et al., 2013).

In this sense, actives of natural origin represent an interesting option to circumvent already known problems with corticosteroids. The plant *Silybum marianum* presents numerous potentialities explored over the years (Carini et al., 1992; Agarwal et al., 2003; Kren and Walterová, 2005; Mallikarjuna et al., 2004). Among all the flavonoids isolated from their standardized extract, silibinin (SB) is considered the

main, either by its expressed amount or as a function of its biological activity (Morazzoni et al., 1992; Pooja et al., 2014). In inflammatory processes, SB stands out for acting in its regulation, in particular, acting on the inhibition of NF- κ B factor, which is related to the expression of many genes linked to inflammation (Gazak et al., 2007; Liu et al., 2015).

Due to its limited bioavailability, SB has already been incorporated into different nanosystems, such as solid lipid nanoparticles (Xu et al., 2013, Sadiq and Rassol, 2014), liposomes (Han et al., 2018), porous silica nanoparticles (Cao et al., 2013), nanosuspension (Zheng et al., 2011), polymeric nanoparticles (Gohulkumar et al., 2014). In the literature, studies that have developed nanosystems with SB to incorporate into semisolid formulations aiming the treatment of dermatitis are restricted. More recently, solid lipid nanoparticles containing SB were incorporated into a Carbopol[®] hydrogel with this therapeutic appeal (Shrotriya et al., 2017).

In previous studies of our research group, pomegranate oil-based NC containing SB were developed and tested regarding their cytotoxicity after cutaneous application (Marchiori et al., 2017a; Marchiori et al., 2018b). This hydrogel reduced the skin damage UVB radiation-induced in mice with higher efficacy than non-nanoencapsulated actives or the silver sulfadiazine, commonly used for the treatment of burns.

Considering the SB potentialities allied to the promising previous results obtained by our research group, this study was designed to obtain and evaluate hydrogels containing pomegranate oil based NC loaded with SB intended for irritant contact dermatitis treatment. To reach this aim, the Pemulen[®] TR2 was selected to prepare the hydrogels from NC suspensions. Pemulen[®] TR2 is a crosslinked copolymer of acrylic acid and long chain methacrylates and therefore of high molecular weight, which has bioadhesive potential. It has already been used in several formulations, both pharmaceutical and cosmetic. It has low irritation and thus is compatible with the skin. Furthermore, it can be used in low concentrations, besides the simplicity of preparation of the hydrogels from it (Ferreira, 2008; Shahin et al., 2011).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

SB and sorbitan monooleate (Span[®] 80) were acquired from Sigma-Aldrich (United States of America); ethylcellulose (Ethocel[®] 10 Premium) was manufactured by Colorcon (United States of America); pomegranate oil was provided by Florien (Brazil); methanol (HPLC grade), acetone, and ethanol were obtained from Dinâmica (Brazil); polysorbate 80 (Tween[®] 80) was obtained from Delaware (Brazil); Pemulen[®] TR2 was kindly donated by Noveon (United States of America); dimethylsulfoxide (DMSO), triethanolamine, formaldehyde and acetic acid were bought from Vetec (Brazil); acetonitrile (HPLC grade) was purchased from LiChrosolv (Germany) and imidazolidinyl urea (Germall[®]) was obtained from Pharma Nostra (Brazil). Hematoxylin-eosin and paraffin were purchased from Merck (Germany). Croton oil was acquired from Sigma Chemical Co. (United States of America). Isoflurane (Forane[®]) was purchased from Baxter (Brazil). Ketamine (Dopalen[®]) and xylazine (Anasedan[®]) were acquired from Ceva (Brazil). All other solvents and reagents were analytical grade and used as received.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of hydrogels containing pomegranate oil-based nanocapsules loaded with silibinin

The NC suspensions were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer method (Fessi et al., 1989; Marchiori et al., 2017b). To provide a viscosity compatible with the topical application, the NC suspensions were thickened with Pemulen[®] TR2 after its milling in a mortar. After dispersion, neutralization was performed with triethanolamine and, finally, 0.6% of imidazolidinyl urea was added as a preservative. Hydrogels containing nanoencapsulated SB were designated as HP-NCSB and the hydrogels containing the NC suspension omitting SB were referred to as HP-NCB. The non-nanoencapsulated SB hydrogels (HP-SB) were prepared by solubilizing the active in DMSO in a beaker and then incorporated into the polymer dispersion in water, ending with the neutralization and addition of the preservative. Table 1 shows the qualitative and quantitative composition of the hydrogels.

2.2.2 Characterization of hydrogels

The obtained formulations were characterized as to the pH, SB content and size distribution of the NCs ($n = 3$). The pH of the formulation was verified by a 10% dispersion of the gel in distilled water using the potentiometer (HANNA, model pH 21), previously calibrated with buffer solutions of pH 4.0 and 7.0. The SB content was determined by HPLC equipment composed of the Shimadzu 10-AD system, SCL-10A controller, LC-10AD pumps and SPD-10A detector, with the following conditions: mobile phase composed of water pH 3.5: acetonitrile (60:40 v/v), flow at 1 mL/min, injection volume of 20 μ L and wavelength of 288 nm. The Kinetex C₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å), the Pre-column Valve SecurityGuard C₁₈ 4 x 3.0 mm and the Rheodyne injection valve were used. To perform the assay, 0.25 g of the sample was diluted in 25 mL of methanol, sonicated for 20 min and submitted to magnetic agitation for 10 min. The samples were centrifuged for 10 min at 3,000 rpm and the supernatant was filtered through a 0.45 μ m porosity membrane and analyzed by the HPLC system. The average particle diameter and the polydispersity index were evaluated by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nano series, Malvern Instruments). For this analysis, the samples were dispersed in ultrapure water (1:500).

Spreadability ($n = 3$) was evaluated according to the methodology of Rigo et al. (2012). In this technique, the samples were carefully placed in the central hole of a glass plate. At 1 min intervals, glass plates with known masses were placed in the sample. On each new plate, using an HP Officejet 4500 Desktop Scanner, the image of the formulation was recorded. To verify the expanded area of the formulation on each applied plate, the ImageJ program (Version 1.49q, National Institutes of Health, USA) was used. The spread factor (Sf) was determined using eq.1, where A = maximum area of expansion (mm²) and P = total weight applied (g).

$$Sf = A / P \quad (1)$$

The rheological evaluation ($n = 3$) was performed using a Brookfield® model DV-I prime rotational viscometer. The spindle chosen was RV06 at the following shear rates: for the HP-NCSB and HP-NCB formulations the speeds were 1, 5, 10, 20, 50 and 100 rpm, while for the HP-SB formulation the speeds were 10, 12, 20, 30, 50 and 100 rpm. To evaluate which rheological model best describes the hydrogels behavior (Bingham, Casson, Ostwald, and Herschel-Bulkley), equations 2-5 were used.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (2)$$

$$\sigma^{0.5} = \sigma_0^{0.5} + \eta^{0.5} \gamma^{0.5} \quad (3)$$

$$\sigma = K \gamma^n \quad (4)$$

$$\sigma = \sigma_0 + K \gamma^n \quad (5)$$

Where: σ is the shear stress, γ is the shear rate, n is the index of plasticity and K is the coefficient of consistency, σ_0 is the yield value or shear stress limit and η is the viscosity.

2.2.3. *In vitro* release test

The *in vitro* release test was performed using Franz-type vertical diffusion cells using a membrane of mixed cellulose esters, presenting a cut-off porosity of 0.22 μm . The study was performed using two types of receptor solutions, one serving the sink condition and another more similar to the physiological conditions: phosphate buffer pH 5.5: ethanol (70:30) and phosphate buffer pH 5.5, respectively. The medium was maintained at 32 °C and constantly stirred with a magnetic bar. An infinite dose of HP-NCSB and HP-SB was deposited on the top of the membrane and at time intervals of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h, 0.5 mL of the receptor solution were collected, which was immediately reset. The aliquots collected from the cells containing HP-NCSB were diluted in 200 μL of methanol and analyzed by HPLC according to the conditions described in 2.2.3 section.

2.2.4 Skin permeation study

The study was performed on Franz-type vertical diffusion cells, having human skin as a membrane. The tissue was obtained from abdominoplasties of female patients whose protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CAAE: 552200016.3.0000.5346/2016). As the medium receptor, phosphate buffer pH 5.5 was used and maintained at 32 °C for 8 h under constant magnetic stirring. To determine the amount of SB in the different skin layers, first the excess formulation was removed and the tape stripping technique was performed to quantify the SB in the *stratum corneum*. For the separation of epidermis and dermis, the tissue was maintained for 45 sec in water at 60°C and thereafter, with the aid of a spatula, the epidermis was removed. SB was extracted from the skin layers with methanol and then vortexed (2 min) and sonicated (30 min). The receptor medium

was also collected for quantification. Each sample was filtered and the SB quantified by the HPLC method described in 2.2.3 section.

2.2.5 Evaluation of bioadhesive properties of hydrogels

In this test, a texturometer (TA.XTplus Texture Analyzer; Stable Microsystem, Godalming, UK) equipped with probe and support was used. At pre-set time (300 s), as well as the force to be applied (5 g), the samples were placed in contact with the biological substrate (pig ear) so that the probe was lifted until the two interfaces were separated. In addition to the formulations of interest in our study, HP-NC SB and HP-SB, a Carbopol Ultrez[®] hydrogel (0.5 %), was prepared for comparison purposes. Finally, adhesion strength (N), work of adhesion (N.mm) and separation distance (mm) were established for each semisolid using the Exponent software (Frank et al., 2014).

2.2.6 *In vivo* anti-inflammatory assessment

2.2.6.1. *Animals*

Male *Swiss* mice weighing about 25-30 g were kept under controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and on a 12 h light-dark cycle. Animals were fed with standard laboratory chow and water *ad libitum*. At least 1 h before performing the experiments, animals were acclimatized to the experimental room. All experiments were performed between 08:00 a.m. and 5:00 p.m. and according to current ethical guidelines for the care of laboratory animals (Zimmermann, 1983). All procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (Process number 6906220917/2017). All experiments were performed blindly and carried out by a single experimenter. The number of animals and amount of irritant agent employed were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the treatments.

2.2.6.2. *Croton oil-induced ear edema*

Ear edema was induced by a single topical application of the irritant agent croton oil (diluted in acetone; 20 μ L) on the right ear of the animal at a concentration of 1 mg/ear (Brum et al., 2016; Piana et al., 2016).

2.2.6.3. *Treatments*

In order to evaluate the treatments' topic anti-inflammatory effect, mice ear was topically treated with 15 mg of the developed formulations immediately after croton oil application. *Swiss* mice were divided into nine groups with 6-8 animals each: naïve (no treatment); croton oil; croton oil + vehicle; croton oil + semisolid containing non-nanoencapsulated silibinin (HP-SB); croton oil + semisolid containing non-nanoencapsulated pomegranate seed oil (HP-OR); croton oil + semisolid containing non-nanoencapsulated silibinin and pomegranate seed oil (HP-SB OR); croton oil + semisolid containing nanoencapsulated pomegranate seed oil (HP-NC B); croton oil + semisolids containing nanoencapsulated silibinin and pomegranate seed oil (HP-NC SB); and croton oil + dexamethasone acetate (1 mg/g) (positive control).

2.2.6.4. *Ear edema measurements*

The ear thickness was measured with a digital micrometer (Digimess, Brazil) before the croton oil application. Mice were previously anesthetized with ketamine/xylazine (90 mg/kg + 30 mg/kg, respectively) and after, the micrometer was applied near the tip of the ear, just distal to the cartilaginous ridges. Croton oil-induced ear edema was characterized by an increase in ear thickness at 6 h after its application (maximum edematogenic effect) or croton oil plus treatments. The difference between basal and at 6 h measures was expressed in μ m. In order to reduce the variation between analyses, only a single investigator performed the measures.

2.2.6.5. *Histology*

Six h after croton oil application or croton oil plus treatments, ears were collected in order to conduct histological analyses. Previously, mice were euthanized, ears were

removed and fixed in a mixture of 80% ethanol, 40% formaldehyde and acetic acid (16:2:1) (Alfac solution). After, samples were embedded in paraffin, sectioned at 5 μm and stained with hematoxylin-eosin. For qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response, a representative area was selected and the cellular inflammatory response was analyzed employing a 20 x objective lens (Oliveira et al., 2014). Only one investigator performed this analysis, to minimize the source of bias.

2.2.7. Cutaneous biometrics test

The cutaneous biometrics test was conducted by topically applying the HP-NC SB and HP-SB semisolids to 15 human healthy volunteers of both genders. The protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CAAE: 77511317.5.0000.5346/2017). Firstly, 3 circles of standardized size were delimited on the forearms, where the formulations were applied, remaining in contact with the skin for 30 min, then being removed. One of the circles received no formulation, serving as the control area. At 30, 60, 90, 120 and 180 min after application, skin irritation was evaluated by the presence or absence of erythema using the Mexameter[®] electronic probe and Skin-pH-Meter[®], Corneometer[®] and Tewameter[®] were used to evaluate the parameters of skin pH, hydration level and transepidermal water loss, respectively. Simultaneously, a sensorial analysis was performed through the questioning of volunteers.

2.2.8. Statistical analysis

Results were expressed as average \pm standard deviation (SD). Statistical significance between groups was evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc test from Newman-Keuls or Bonferroni or from Tukey, when appropriate, and student's t-test. For the cutaneous biometrics test, ANOVA analysis of variance of repeated measures was used. Results of *in vivo* evaluation were presented as the mean + standard error of the mean (SEM), which are reported as geometric means plus their respective 95% confidence limits. The maximum inhibitory effect (E_{max}) was calculated in relation to the response of the control group. Statistical analysis was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Newman-

Keuls' post-tests. All tests were performed using GraphPadPrism 6.0 software (San Diego, CA, USA). The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Hydrogels characterization

The characteristics of the hydrogels are presented in Table 2. The pH evaluation showed slightly acidic values for the formulations containing the NC suspensions and near neutrality for the HP-SB, but there was no statistically significant difference between both hydrogels containing NC (loaded and unloaded). The average diameter of the nanostructures in the hydrogel is in the submicrometer range, without significant variation between them. With respect to IPD, the values indicated the particle size's homogeneity since they were close to 0.2. The SB content for both HP-NCSB and HP-SB presented values close to the theoretical concentration of 1 mg/mL and there was no significant difference between them. The formulations had very similar spread factors and, according to statistical analysis, there was no significant variation among the three formulations ($p > 0.05$).

3.2 Evaluation of rheological behavior

Based on the results observed, the formulations presented non-Newtonian behavior since the viscosity decreases as the shear rate increases. The same can be observed in Figure 1, which shows the rheogram of the developed hydrogels. Therefore, formulations that have their viscosity decreased with increasing applied force demonstrate that the three-dimensional and embarrassed structure of these molecules is disrupted, facilitating flow by exerting a force on them (Fontana et al., 2011). The rheograms were better fitted to the Ostwald model for all formulations (Table 3). The flow index (n) and the consistency index (K) were also established (Table 4).

3.3 *In vitro* release test of SB from hydrogels

In Figure 2, it can be seen for both media containing only the buffer as in the medium with ethanol, the amount of SB released from the HP-NCSB formulation was

significantly higher than that of HP-SB, approximately four folds: for the medium containing phosphate buffer, the amounts were $2.25 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ and $0.49 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ and for medium plus ethanol were $4.73 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ and $1.14 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ for HP-NCSB and HP-SB formulations, respectively. In view of these results, it can be said that the nanoencapsulation was responsible for increasing the "exit" of the active from the hydrogel, a characteristic corroborated by the similar results presented by gellan gum hydrogels developed in our research group (Marchiori et al., 2017a).

3.4 Skin permeation study

In relation to the permeation study, it was observed that the total amount of SB retained in the skin from the HP-NCSB and HP-SB formulations were $2.85 \pm 0.30 \mu\text{g}$ and $1.79 \pm 0.18 \mu\text{g}$, respectively ($p < 0.05$). Figure 3 represents the SB distribution in the different skin layers, in which it is noted that the formulation containing the nanoencapsulated SB provided a greater amount of active localized in the *stratum corneum* when compared to the formulation containing the non-nanoencapsulated SB ($45,28 \pm 7,70 \mu\text{g/g}$ and $20, 22 \pm 3,35 \mu\text{g/g}$, respectively) which was significantly concentrated more in the dermis, at the end of the eight-hour experiment. As for the receptor medium, for both formulations, SB quantification was reduced and there was no statistically significant difference between them, indicating that nanoencapsulation did not increase the tendency to systemic absorption, in the same way, that other similar studies have already described (Contri et al., 2014; Beber et al., 2016).

3.5 Evaluation of bioadhesive properties of hydrogels

In the bioadhesion assay, adhesion strength (mN), separation distance (mm) and work of adhesion (mN.mm) were evaluated comparing the formulations HP-NCSB, HP-SB to a Carbopol Ultrez[®] hydrogel 0.5%, which is also used as a bioadhesive polymer. For all the parameters studied, the HP-NCSB formulation significantly stood out when compared to the Carbopol Ultrez[®] 0.5% hydrogel ($p < 0.05$). Regarding its performance in relation to the HP-SB, it also showed important results, because it presents the highest works of adhesion and separation distance of skin tissue, as presented in Table 5 ($p < 0.05$).

3.6 *In vivo* anti-inflammatory assessment

3.6.1. Assessment of ear edema on croton oil-induced inflammation

Ear edema induced by croton oil was employed to verify the anti-inflammatory activity of developed hydrogels. Six h after its application, croton oil increased the mice ear thickness with E_{max} of 68 ± 4 μm . All hydrogels tested were capable to reduce effectively the ear edema with maximum inhibitions of $54 \pm 6\%$, $57 \pm 4\%$, $51 \pm 5\%$, $46 \pm 5\%$ and $34 \pm 4\%$ for HP-NC B, HP-SB OR, HP-OR, HP-SB, and vehicle, respectively. Importantly, HP-NC SB was capable to reduce the ear edema with maximum inhibition of $85 \pm 4\%$, which was similar to the effect presented by positive control dexamethasone ($95 \pm 2\%$). It was also observed that nanoencapsulation improved SB and OR antiedematogenic effect, which can be evidenced by HP-NC SB. It was also observed that silibinin presence (HP-NC SB) increased nanoencapsulated pomegranate seed oil effect (Figure 4).

3.6.2. Evaluation of leukocyte infiltration on croton oil-induced inflammation

It was also verified the ability of the hydrogels in reducing leukocyte infiltration on damaged tissue. Topical application of croton oil on mice ear was capable to induce an increase in the number of polymorphonuclear cells per field on histological analysis (57 ± 3 inflammatory cell per field) when compared to naïve group (21 ± 3 inflammatory cell per field). Among the semisolids tested, topical treatments presented the ability to reduce inflammatory cells infiltration (39 ± 5 , 28 ± 3 and 21 ± 3 inflammatory cell per field to HP-SB OR, HP-NC B, and HP-NC SB, respectively) when compared to untreated group (croton oil). These effects were similar to that presented by the positive control dexamethasone (30 ± 2 inflammatory cell per field) (Figure 5).

3.7 Cutaneous biometrics test

The evaluation of the biometric parameters is represented graphically in Figure 6 (a, b, c, d). In order to verify if any component of the formulations under study would stimulate some irritation or induce some modification in the normal skin tissue conditions, a comparison was made between the area of application of the formulations and the control area, in their respective times. Thus, for all the biometric aspects

included in the study, no statistically significant difference was observed indicating that the components of the NC preparation and the ingredients selected for the hydrogels development are suitable and maintain the skin integrity. This finding was corroborated by the sensorial analysis through the questionnaires applied, because it was possible to conclude through the perception of the volunteers in the face of some discomfort that, at the end of the experiment, no abnormalities were detected.

4. DISCUSSION

It is known that topical dosage forms provide advantages ranging from the convenience of application to the patient to aspects related to the process of penetration into the skin tissue. When a formulation is chosen to carry nanostructured systems, such evaluations are also pertinent, in particular, to ascertain whether the use of such release systems can generate some modifications as compared to formulations developed in a conventional manner.

The physicochemical characterization of hydrogels (Table 2) showed that the average particle size and IPD of NC in HP-NCSB and HP-NCB formulations were suitable for skin application because they are able to deposit in the skin tissue, by means of an intimate contact with the *stratum corneum*, as well as showed homogeneity in the distribution of particle size present in the formulation which, as already described in studies, should present values close to 0.2 (Beck et al., 2011; Chassot et al., 2015).

In addition, the particle size of the suspended nanostructures did not present a significant statistical difference in relation to the hydrogel, suggesting that the proposed pharmaceutical dosage form maintains the integrity of the NCs when prepared. Slightly acidic skin pH has bactericidal and fungicidal potential, meaning that the formulations are compatible with skin tissue. Regarding literature, other studies have reported hydrogels in this pH range (Leonardi et al., 2002; Ourique et al., 2011; Rigo et al., 2015).

In order to verify that the hydrogels would promote an easy application to the skin, the spread factor of the formulations was determined and, therefore, it was observed that, even without statistical difference among the three formulations, those containing nanostructured systems present a lower value, which was already observed in other studies (Marchiori et al., 2010, Rigo et al., 2015, De Lima, 2015). In conjunction

with the spread capacity of a semisolid formulation, the rheological evaluation becomes pertinent, as it is possible to confirm the non-Newtonian pseudoplastic flow, as shown by the rheograms and viscograms (Figures 1 and 2). The behavior of a non-Newtonian fluid is determined by the flow index (n) (Almeida and Bahia, 2003).

In order to better understand and confirm the behavior observed from the rheograms of the formulations, four rheological models were evaluated (Table 3) and, through the regression coefficient (r), the one that best fits the formulations is the Ostwald model, which often describes the non-Newtonian pseudoplastic flow. This type of rheological property presented by the developed hydrogels is desirable because it is interesting that they are able to flow and spread easily in the applied area, suggesting that the components chosen for the development of the formulations do not compromise the flow (Rigo et al., 2015).

To investigate the hydrogels ability to release SB, Franz type diffusion cells were used and, as a barrier to this process, synthetic membranes used in previous studies and also recommended by the FDA were employed (Da Silva et al., 2009; FDA, 1997). As is well known, the release process involves a set of factors and is not given only in relation to the drug/active released from the nanoparticles, but also involves the release of the nanoparticle from the pharmaceutical dosage form. Due to this event, the aliquots collected from the HP-NCSB release medium were diluted with methanol (Vargas et al., 2013).

In these same conditions, it can be seen that for the medium containing only the buffer and in the medium with ethanol, the amount of SB released from the HP-NCSB formulation was significantly higher than that of the HP-SB formulation. Thus, when incorporating the SB to the nanocarrier, it fulfilled its role in modifying the characteristics of the active, considering that the SB has lipophilic characteristics and, therefore, considerably improved its release from a hydrophilic formulation. This observation is corroborated by the evaluation of the HP-SB formulations by light microscopy, in which it was possible to see that SB, in its free form, aggregates in the formulation and therefore does not present homogeneous distribution, which occurs as a function of its lipophilia (data not shown). Moreover, another observation is pertinent to be made, because by observing the amount of SB released, this equivalence allows to infer that, for comparative analyzes between nanostructured and conventional gels, both media lead to the same result, not interfering in the global interpretation of the same ones.

The experiment used the human skin implies a greater reliability in the interpretation of the results, allowing the comparison of the performance of the active deposition in the layers of the skin. Thus, through Figure 4 we can observe that the nanoencapsulation promoted greater SB retention in the *stratum corneum*, compared to the hydrogel containing the free active. This result can be explained by the fact that the *stratum corneum* works as a "deposit" for nanostructures, as has been observed in previous studies, and thus allow a gradual release of the active to the subsequent skin layers. This behavior is important in the treatment of skin inflammatory diseases, such as irritant contact dermatitis, in which after the irritating agent damages the skin surface, the release of inflammatory mediators by the epidermal cells initiate, besides that this release profile can provide a more efficient therapy (Marto et al., 2018; Kaur et al., 2017).

The SB in HP-SB reached the dermis in a greater extension than SB in HP-NCSB. This could be attributed to the greater surface area of NC, which increases the interactions with the *stratum corneum*. Besides, ethylcellulose also can play a role in the release control for the deeper layers of the skin, because it is a polymer with hydrophobic characteristics.

In order to verify if Pemulen[®] TR2 could impart a greater bioadhesion by forming a NC carrier gel, the force required to breaks the interaction between the hydrogel and the chosen template membrane was analyzed by the detachment force method. As observed in the study, the hydrogels produced with Pemulen[®] TR2 stood out against the comparative hydrogel of Carbopol[®] Ultrez, already described in studies with bio/mucoadhesive appeal (Ciurba et al., 2015; Panda et al., 2016; Marques et al., 2017).

Although both polymers are derived from acrylic acid, Pemulen[®] has a methacrylate moiety in its chain, which gives it a lipophilic character as well, which may aid its interaction with the upper skin layers. In addition, especially in the aspect of the work necessary to break the bioadhesive interaction, in which the best result was the hydrogel containing the NCs, we can infer that the nanostructures contributed to the bioadhesiveness since its polymeric membrane consists of ethylcellulose.

Silibinin and pomegranate seed oil are naturally occurring compounds that have been extensively studied by their biological activities, among them, antioxidant and anti-inflammatory effects (Gabrielová et al., 2015; Surai, 2015; Boroushaki et al., 2016; Lin et al., 2017; Marchiori et al., 2017). Considering that substances that possess

antioxidant activity usually also present anti-inflammatory effect, we investigated the anti-inflammatory activity of silibinin and pomegranate seed oil employing a skin inflammation model induced by irritant agent croton oil (Křen and Walterová, 2005; Abdelazim, 2017).

It has been well known that croton oil, by its main constituent 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), is able to induce experimentally skin inflammation in rodents, evidenced by erythema, edema and polymorphonuclear leukocyte infiltration (Stanley et al., 1991; Bald et al., 2016; Piana et al., 2016). We have employed this irritant agent to induce an inflammatory process in mice ear and evaluated semisolid formulations developed for their performance in reducing this inflammatory damage on mice skin.

Edema is recognized as the first signal and a marker of skin inflammation, resulting firstly from increased vascular permeability and proliferation of epidermal keratinocytes (Medzhitov, 2008; Xu et al., 2016). Here, we demonstrated that all tested semisolid formulations reduce the ear edema. Importantly, HP-NC SB presented maximum antiedematogenic effect, similar to those shown by dexamethasone acetate, a substance clinically used to treat skin inflammatory diseases.

Another characteristic of skin inflammation is leukocyte infiltration to damaged tissue (Stanley et al., 1991; Ortega-Gómez et al., 2013; Xu et al., 2016). It was observed in the histological analysis that semisolid formulations HP-SB OR, HP-NC B and HP- NC SB reduced the inflammatory cells infiltration. This result shows the importance of the compounds association and, also, of the nanoencapsulation technique. Reducing inflammatory cells infiltration is an important beneficial effect conferred by these formulations since disorderly cells infiltration could lead to a chronic inflammatory process (Nestle et al., 2009).

The anti-inflammatory activity of silibinin and pomegranate seed oil into semisolid formulations was already reported by our research group employing an UVB-induced skin inflammation model (Marchiori et al., 2017a). Our results are in accordance to Marchiori et al. (2017a) which observed that semisolid formulations containing silibinin and pomegranate seed oil, similar to those developed by us, reduced the edema and the inflammatory cells infiltration to irradiated tissue.

This anti-inflammatory effect caused by silibinin and pomegranate seed oil can be linked to their inhibitory potential on NF- κ B inflammatory pathway as previously described (Ramasamy and Agarwal, 2008; Kim et al., 2013; Kumar et al., 2015; Mandal

et al., 2017). NF- κ B is normally found in an inactive form on cellular cytoplasm, anchored to inhibitory molecules of the I κ B family. Inflammatory mediators induce I κ B phosphorylation and degradation, releasing NF- κ B, which enters the cellular nucleus, activating the transcription of inflammation response-related genes, as cytokines synthesis and inflammation-related enzymes. Thus, its inhibition could lead to anti-inflammatory effects (Tak and Firestein, 2001; Israël, 2010).

Here, we demonstrated great *in vivo* anti-inflammatory efficacy of our developed hydrogels containing SB and OR. Among these formulations, nanoencapsulated silibinin and pomegranate seed oil into hydrogel (HP-NC SB) showed to be the most promising one, evidencing the importance of the compounds association, by a possible synergism occurring between both, and reinforcing the relevance of the drugs nanoencapsulation.

We also evaluated the cutaneous biometry in order to test the performance of the formulations developed under the actual application conditions, with the participation of human volunteers. These evaluations are useful in the dermocosmetic area, as they use non-invasive instruments, useful not only to evaluate changes in the skin due to some pathology, but also to evaluate the safety and efficacy of topical products (Zhai et al, 2000; Gonçalves and Campos, 2009; Narbut et al., 2016).

Firstly, through the Mexameter[®] probe, it was found that both formulations (HPNCSB and HPSB) did not stimulate an inflammatory response in the skin. This data becomes even more relevant as this probe can detect small variations in tissue staining satisfactorily (Clarys et al., 2000; Park et al., 2006).

Another biometric parameter evaluated was the barrier function exerted by the *stratum corneum*, which through the existing lipid layer, prevents excessive water loss, thus guaranteeing a healthy condition to the tissue. This characteristic was observed by the Tewameter[®] probe, and through the measurements, it was concluded that a disorganization of this barrier did not occur since there was no statistical variation of any of the formulations applied before its respective control. Similarly, to the parameters reported above, pH and skin hydration as measured by Skin-pHmeter[®] and Corneometer[®] probes were not altered by any of the formulations over time. The skin pH assists in maintaining the integrity of the *stratum corneum*, as well as having an antimicrobial function, thus contributing to tissue functionality (Eberlein-König et al., 2000; Duarte, 2013; Blaak et al., 2017).

5. CONCLUSION

Through the set of results, it was observed that the hydrogel containing silibinin nanocapsules was successfully developed using Pemulen® TR2 as a gel-forming polymer. The spreadability and rheology data demonstrated that the formulation provides a uniform application on the skin. In addition, the nanoencapsulation of silibinin provided a more efficient retention in the stratum corneum than the formulation containing silibin in its non-nanoencapsulated form and stood out against the other formulations in the bioadhesive potential. In the animal model of irritant contact dermatitis presented a similar result to that of dexamethasone, a corticoid used in the treatment of this cutaneous disease. In the evaluation in humans, the formulation maintained the normal conditions of the cutaneous tissue, without showing irritative potential. In this way, the hydrogel containing silibinin nanocapsules can be considered compatible with the skin and a promising alternative for the treatment of irritant contact dermatitis.

REFERENCES

- Abdelazim, S. A. A., 2017. Effect of silymarin as natural antioxidants and antimicrobial activity. *Nutri Food Sci. Int. J.* 2(3), 001-006.
- Agarwal, C., Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A. K., Tecklenburg, M., Sclafani, R. A., Agarwal, R., 2003. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene.* 22, 8271–8282.
- Almeida, I. F., Bahia, M. F., 2003. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetic & Toiletries.* 15, 96-100.
- Alves, M. P., Scarrone, A. L., Santos, M., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 341, 215–220.
- Bald, T., Landsberg, J., Jansen, P., Gaffal, E., Tuting, T., 2016. Phorbol ester-induced neutrophilic inflammatory responses selectively promote metastatic spread of melanoma in a TLR4-dependent manner. *Oncoimmunology.* 5(2), 1-10.
- Balzus, B., Sahle, F. F., Hönzke, S., Gerecke, C., Schumacher, F., Hedtrich, S., Kleuser, B., Bodmeier, R., 2017. Formulation and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 115,122–130.

Beber, T. C., Andrade, D. F., Chaves, P. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Beck, R. C. R., 2016. Cationic Polymeric Nanocapsules as a Strategy to Target Dexamethasone to Viable Epidermis: Skin Penetration and Permeation Studies. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16, 1331–1338.

Beck, R. C. R.; Guterres, S. S; Pohlmann, A. R., 2011. *Nanocosmetics and Nanomedicine – new approaches for skin care.* Springer: Berlin.

Borouhaki M. T.; Mollazadeh, H.; Afshari, A. R., 2016. Pomegranate seed oil: A comprehensive review on its therapeutic effects. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, v. 7, p. 430–442.

Blaak, J. D., Dähnhardt, D., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Bielfeldt, S., Wilhelm, K. P., Wohlfart, R., Staib, P., 2017. A plant oil-containing pH 4 emulsion improves epidermal barrier structure and enhances ceramide levels in aged skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* 39, 284–291.

Brum, T. F., Camponogara, C., Jesus, R. S, Belke, B. V., Piana, M., Boligon, A. A, Pires, F. B., Oliveira, S. M., da Rosa M. B., Bauermann, L. F., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. *J. Ethnopharmacol.* 193, 60-67.

Cao, X., Deng, W., Fu, M., Zhu, Y., Liu, H., Wang, L., Zeng, J., Wei, Y., Xu, X., Yu, J., 2013. Seventy-two-hour release formulation of the poorly soluble drug silybin based on porous silica nanoparticles: In vitro release kinetics and in vitro/in vivo correlations in beagle dogs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 64–71.

Carini, R., Comoglio, A., Albano, E., Poli, G., 1992. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. *Biochemical pharmacol.* 43, 2111-2115.

Chassot, J. M., Ribas, D., Silveira, E. F., Grünspan, L. D., Pires, C. C., Farago, P. V., Braganhol, E., Tasso, L., Cruz, L., 2015. Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development, In Vitro Cytotoxicity, and In Vivo Evaluation of Acute Lung Injury. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 1–10.

Chávez, G. E, Estrada, R., C, Chávez, G. L, Armendáriz, F. G. V., 2013. Estudio preliminar de la prescripción indiscriminada de corticoesteroides tópicos en medicina general. *Dermatol. Rev. Mex.* 57, 433-437.

Ciurba, A., Lazăr, L., Antonoaea, P., Georgescu, A. M., Vari, C. E., Todoran, N., 2015. In vitro/in vivo performance study of new metronidazole periodontal gel formulations. *Farmacia.* 63, 11-19.

Clarys, P., Alewaeters, K., Lambrecht, R., Barel, A. O., 2000. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter. *Skin Res. Technol.* 6, 230–238.

Contri, R. V., Frank, L. A., Kaiser, M., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., 2014. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *Int. J. Nanomedicine*, 9, 951–962.

Da Silva, J. A., Santana, D. P., Bedor, D. G. C., Borba, V. F. C, Lira, A. A. M., Egito, E. S. T., 2009. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quím. Nova*. 32, 1389-1393.

De Lima, J. A. Desenvolvimento de hidrogéis mucoadesivos contendo nanocápsulas catiônicas de clotrimazol para o tratamento de candidíase vulvovaginal. 2015. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

Eberlein-koè N., Schäfer, T., Huss-Marp, J., Darsow, U., Möhrensclager, M., Herbert, O., Abeck, D., Krämer, U., Behrendt, H., Ring, J., 2000. Skin Surface pH, Stratum Corneum Hydration, Trans-epidermal Water Loss and Skin Roughness Related to Atopic Eczema and Skin Dryness in a Population of Primary School Children. *Acta Derm. Venereol.* 80,188-191.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P. 1988. Procède de préparation dês systèmes coloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. European Patent, 0274961 A1.

Ferreira, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 3ª ed. Pharmabooks: São Paulo, 2008.

Ferreira, B. I. A. L. S., Freitas, E. N. , De Almeida, P. T., Mendes, T. H. C., Da Silva, V. Y. N. E, Kashiwabara, T. G. B., 2014. Dermatites: diagnóstico e terapêutica. *Brazilian J. Surgery Clin, Res.* 5, 26.

Food and drug administration. Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms. USA. 1997. 37p.

Fontana, M. C., Coradini, K., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Beck, R. C. R., 2009. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 254–263.

Frank, L. A., Sandri, G., D'Autilia, F., Contri, R.V., Bonferoni, M.C., Caramella, C., Frank, A.G., Pohlmann, A.R., Guterres, S. S., 2014. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 9, 3151–316.

Gabrielová, E., Křen, V., Jabůrek, M., Modrianský, M., 2015. Silymarin component 2,3-dehydrosilybin attenuates cardiomyocyte damage following hypoxia/reoxygenation by limiting oxidative stress. *Physiol. Res.* 64, p. 79-91.

Gazak, R.; Walterová, D.; Kren, V., 2007.Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Current Medic. Chem.*14, 315-338.

- Gohulkumar, M., Gurushankar, K., Prasad, N., Krishnakumar, N., 2014. Enhanced cytotoxicity and apoptosis-induced anticancer effect of silibinin-loaded nanoparticles in oral carcinoma (KB) cells. *Mater. Sci. Eng: C*. 41,274–282.
- Gonçalves, G. M. S, Campos, P. M. B., 2009. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazil. J. Pharm. Sci.* 45, 1-10.
- Han, L., Guo, K., Gu, F., Zhang, Y., Li, K., Mu, X., Liu, H., Zhou, X., Luo, W., 2018. Effects of silibinin-loaded thermosensitive liposome-microbubble complex on inhibiting rabbit liver VX2 tumors in sub-hyperthermia fields. *Exp. Ther. Med.* 15, 1233-1240.
- Israël, A., 2010. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1-14.
- Kaur, A., Katiyar, S.S., Kushwah, V., Jain, S., 2017. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. *Nanomedicine: NBM.* 13, 1473–1482.
- Kim, B. R., Seo, H. S., Ku, J. M., Kim, G.J., Jeon, C.Y., Park, J.H., Jang, B.H., Park, S.J., Shin, Y.C., Ko, S.G., 2013 Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells. *Inflam. Res.* 62(11), 941-950.
- Kostner, L.; Anzengruber, F., Guillod, C.; Recher, M.; Grendelmeier, P.S.; Navarinl, A. A. 2017. Allergic Contact Dermatitis. *Immunol Allergy Clin*, 37, 141–152.
- Külkamp-Guerreiro, I.C., Terroso, T.F., Assumpção, E. R., Berlitz, S.J., Contri, R.V., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2012. Development and Stability of Innovative Semisolid Formulations Containing Nanoencapsulated Lipoic Acid for Topical Use. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12, 7723–7732.
- Kren, W.; Walterová, D. 2005. Silybin and Silymarin – new effect and applications. *Biomedical Paper.* 149, 29–41.
- Kumar, R.; Deep, G.; Agarwal, R., 2015. An overview of ultraviolet B radiation-induced skin cancer chemoprevention by silibinin. *Current Pharmacology Reports.* 1, 206-215.
- Lin, T-K.; Zhong, L.; Santiago, J. L., 2017. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 70.
- Lázaro, A. Garcia, M. 2010. Corticosteroides tópicos. *Informacion terapêutica del Sistema Nacional de Salud.* 34, 83-88.
- Leonardi, G. R.; Gaspar, L. R.; Campos, P. M., 2002. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An. Bras. Dermatol.* 77, 563-569.
- Liu, W. Li, Y., Zheng, X., Zhang, K., Du, Z. 2015. Potent inhibitory effect of silibinin from milk thistle on skin inflammation stimuli by 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate. *Food & Function.* 6, 3712-3719.

Marchiori, M. C. L., Rigon, C., Camponogara, C., Oliveira, S. M., Cruz, L., 2017 a. Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice. *J. Photochem. Photobiol. B.* 170, 25–32.

Marchiori, M. C. L., Rigon, C., Copetti, P. M., Sagrillo, M. R., Cruz, L., 2017b. Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. *AAPS PharmSciTech*, 1-11.

Marques, A. C., Rocha, A. I., Leal, P., Estanqueiro, M., Lobo, J. M. S., 2017. Development and characterization of mucoadhesive buccal gels containing lipid nanoparticles of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 533, 455–462.

Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Singh, R. P., Agarwal, C., Agarwal, R., 2004. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and akt signaling. *Cancer Res.* 64, 6349–6356.

Mandal, A., Bhatia, D., Bishayee, A., 2017. Anti-Inflammatory Mechanism Involved in Pomegranate-Mediated Prevention of Breast Cancer: the Role of NF- κ B and Nrf2 Signaling Pathways. *Nutrients*, 9 (5), 1-13.

Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454, 428-435.

Morazzoni, P., Magistretti, M. J., Giacheiti, C. Zanolo, G. 1992. Comparative bioavailability of Silipide, a new flavanolignan complex, in rats. *Eur. J. Drug Metabolism Pharmacokin.* 17, 39-44.

Marto, J., Ruivo, E., Lucas, S. D., Gonçalves, L. M., Simões, S., Gouveia, L. F., Felix, R., Moreira, R., Ribeiro, H. M., Almeida, A. J., 2018. Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 127, 1–11.

Motta, A. A., Aun, M. V., Kalil, J., Bianchi, P. G. 2011. Dermatite de contato. *Revista brasileira alergologia imunopatologia.* 34, 73-82.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113-142.

Narbutt, J., Bednarski, I. A., Lesiak, A., 2016. The effect of an emollient with benfotiamine and Biolin prebiotic on the improvement of epidermal skin function. *Adv. Dermatol. Allergol.* 3, 224–231.

Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J., Nickoloff, B. J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(10), 679-691.

Oliveira, S. M., Silva, C. R., Wentz, A. P., Paim, G. R., Correa, M. S., Bonacorso, H. G., Prudente, A. S., Otuki, M. F., Ferreira, J., 2014. Antinociceptive effect of 3-(4-

fluorophenyl)-5-tri-fluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 396-404.

Ortega-Gómez, A., Perretti, M., Soehnlein, O., 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.* 5 (5), 661-674.

Ourique A. F., Melero, A., Da Silva, C. B., Schaefer, U. F., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Lehr, C. M., Kostka, K., H., Beck, R. C., 2011. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 95–101.

Panda, B., Subhadarsini, R., Mallick, S., 2016. Biointerfacial phenomena of amlodipine buccomucosal tablets of HPMC matrix system containing polyacrylate polymer/ β -cyclodextrin: Correlation of swelling and drug delivery performance. *Expert Opin. Drug Deliver.* 13, 633- 643.

Park, E. S., Na, J. I., Kim, S. O., Huh, C. H., Youn, S. W., Park, K. C., 2016. Application of a pigment measuring device – Mexameter – for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. *Skin Res. Technol.* 12, 298–302.

Pegoraro, N.S., Barbieri, A. V., Camponogara, C., Mattiazzi, J., Brum, E. S., Marchiori, M. C. L., Oliveira, S. M., Cruz, L., 2017. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 150, 32–40.

Piana, M., Camponogara, C., Boligon, A. A., Machado, M. M., De Brum, T. F., Oliveira, S. M., Bauermann, L. F., Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves 2016. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 179, 16-21.

Pooja, D., Bikkina, D. J., B., Kulhari, H., Nikhila, N., Chinde, S. Raghavendra, Y. M., Sreedhar B., Tiwari, A. K. 2014. Fabrication, characterization and bioevaluation of silibinin loaded chitosan nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 267–273.

Ramasamy, K.; Agarwal, R., 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett.* 269, 352–362.

Rigo, L. A., Weber, J., Silva, C. B., Beck, R. C. R., 2012. Evaluation of the Spreadability of Pharmaceutical or Cosmetic Semisolid Formulations Using Scanned Images. *Lat. Am. J. Pharm.* 31, 1387-1391, 2012.

Rigo, L. A., Da Silva, C. R., Oliveira, S. M., Cabreira, T. N., Da Silva, C. B., Ferreira, J., Beck, R. C., 2015 Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB-radiation induced skin injury in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 11-17.

Stanley, P. L., Steiner, S., Havens, M., Tramposch, K. M., 1991. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol.* 4, 262-271.

Surai, P. F., 2015. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4, 204-247.

Sadiq, A. A.; Rassol, A. A. 2014. Formulation and evaluation of silibinin loaded solid lipid nanoparticles for peroral use targeting lower part of gastrointestinal tract. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 55-67.

Shahin, M., Hady, S. A., Hammad, M., Mortada, N., 2011. Optimized formulation for topical administration of clotrimazole using Pemulen polymeric emulsifier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37(5), 559–568.

Shrotriya, S. N.; Vidhate, B. V.; Shukla, M. S. 2017. Formulation and development of Silybin loaded solid lipid nanoparticle enriched gel for irritant contact dermatitis. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 41, 164-173.

Tak, P. P.; Firestein, G. S., 2001. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107 (1), 7-11.

Vargas P. N., Aldrigui, B. R., Bochi, L. C. S., Roggia, I., Alves, M. P., 2013. Formulações semissólidas contendo meloxicam nanoencapsulado: estudos de liberação “in vitro”. *Disc. Scientia.*14, 35-44.

Xu, P., Yin, Q., Shen, J., Chen, L., Yu, H., Zhang, Z., Li, Y., 2013. Synergistic inhibition of breast cancer metastasis by silibinin-loaded lipid nanoparticles containing TPGS. *Int. J. Pharm.* 454, 21– 30.

Xu, X. T., Mou, X. Q., Xi, Q. M., Liu, W. T., Liu, W. F., Sheng, Z. J., Zheng, X., Zhang, K., Du, Z. Y., Zhao, S. Q., Wang, S. H., 2016. Anti-inflammatory activity effect of 2-substituted-1,4,5,6-tetrahydrocyclopenta[b]pyrrole on TPA-induced skin inflammation in mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (21), 5334-5339.

Zack, B. Arrandale, V., Holness, D. L. 2018. Skin-specific training experience of workers assessed for contact dermatitis. *Occup. Med.* 68, 203-206.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 109-110.

Zhai, H., Brachman, F., Pelosi, A., Anigbogu, A., Ramos, M.B., Torralba, M. C., Maibach, H.I., 2000. A bioengineering study on the efficacy of a skin protectant lotion in preventing SLS-induced dermatitis. *Skin Res. Technol.* 6: 77–80.

Zheng, D., Wang, Y., Zhang, D., Liu, Z., Duan, C., Jia, L., Wang, F., Liu, Y., Liu, G., Hao, L., Zhang, Q., 2011. In vitro antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. *Cancer Lett.*307, 158–164.

Table 1. Qualitative and quantitative composition of hydrogels

Component	HP-NCSB	HP-NCB	HP-SB
Suspension of NC (mL)	10.00	10.00	-
DMSO (mL)	-	-	0.66
Distilled water (mL)	-	-	q.s.p. 10.00
Pemulen® TR2 (g)	0.07	0.07	0.07
Triethanolamine (µL)	100.00	10.00	100.00
Imidazolidinyl urea (µL)	200.00	200.00	200.00

Table 2. Physico-chemical characteristics of the hydrogels developed (average \pm standard deviation, n=3, t-test and Anova).

Formulation	Content (mg/g)	pH	DM (nm)	IPD	Sf (mm²/g)
HP-NCSB	0.99 \pm 0.01	6.70 \pm 0.15	184 \pm 26	0.22 \pm 0.04	3.49 \pm 0.49
HP-NCB	-	6.72 \pm 0.34	161 \pm 20	0.22 \pm 0.03	3.42 \pm 0.40
HP-SB	0.98 \pm 0.02	7.26 \pm 0.24	-	-	4.18 \pm 0.33

Table 3. Regression coefficient (r) for the different rheological models (average \pm standard deviation, n=3).

Formulation	Bingham	Casson	Ostwald	Hershel-Bulkley
HP-NCSB	0.9013 \pm 0.036	0.9572 \pm 0.020	0.9939 \pm 0.003	0.9877 \pm 0.009
HP-NCB	0.9418 \pm 0.016	0.9771 \pm 0.009	0.998 \pm 0.002	0.997 \pm 0.001
HP-SB	0.9872 \pm 0.004	0.9931 \pm 0.009	0.995 \pm 0.005	0.9948 \pm 0.007

Table 4. Flow index (n) and consistency index (K) of the hydrogels (average \pm standard deviation, n=3).

Formulation	n	K
HP-NCSB	0.26 \pm 0.02	164934.50 \pm 13937.20
HP-NCB	0.27 \pm 0.01	157679.70 \pm 10348.38
HP-SB	0.37 \pm 0.02	49404.15 \pm 6528.26

Table 5. Bioadhesive parameters of hydrogels. Average \pm standard deviation, $n = 3$, Anova; different letters for the same parameter indicate that there is a statistically significant difference).

Parameter	HP-SB	HP-NCSB	HC*
Adhesion force (mN)	90 ± 20^{ab}	130 ± 30^b	60 ± 0^a
Separation distance (mm)	3.76 ± 0.38^a	5.46 ± 0.23^b	4.87 ± 0.21^b
Work (mN.mm)	69.65 ± 15.63^a	120.14 ± 7.25^b	90.20 ± 5.15^a

HC*: carbopol hydrogel. Different letters, for the same parameter, indicate that there is a statistically significant difference.

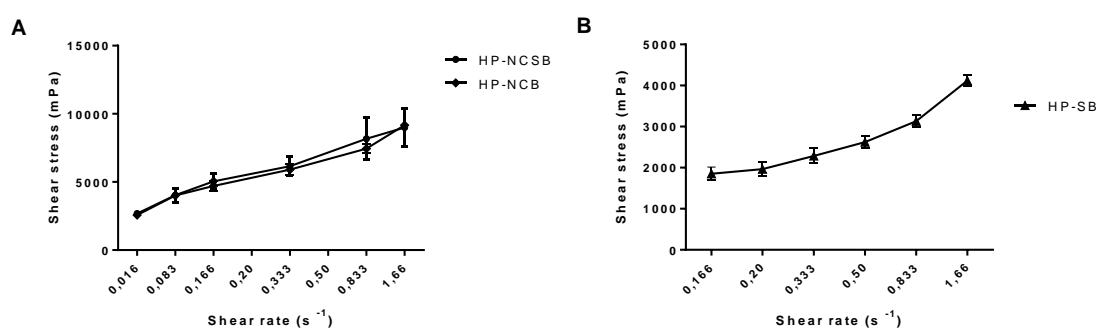


Figure 1. Rheograms of hydrogels (average \pm standard deviation, $n = 3$). (A) hydrogels containing nanocapsules; (B) hydrogels containing non-nanoencapsulated SB.

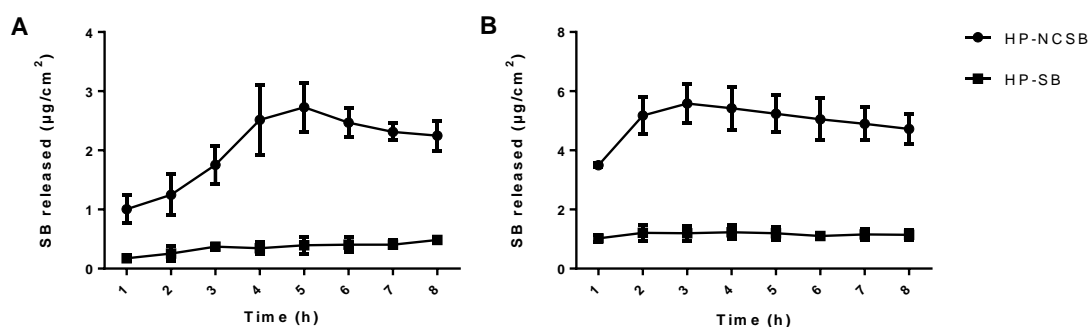


Figure 2. Amount of drug released as a function of membrane area over time (average \pm standard deviation, $n = 3$). (A) phosphate buffer receptor medium pH 5.5 and (B) phosphate buffer pH 5.5 and ethanol.

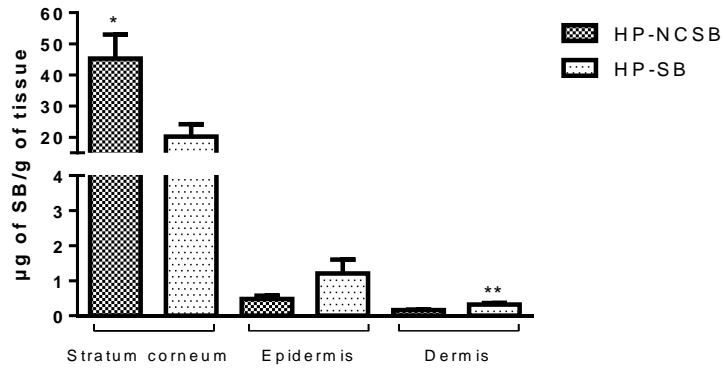


Figure 3. Distribution of SB in the skin layers. Average \pm standard deviation, $n = 5$, t -test, $*p < 0.05$.

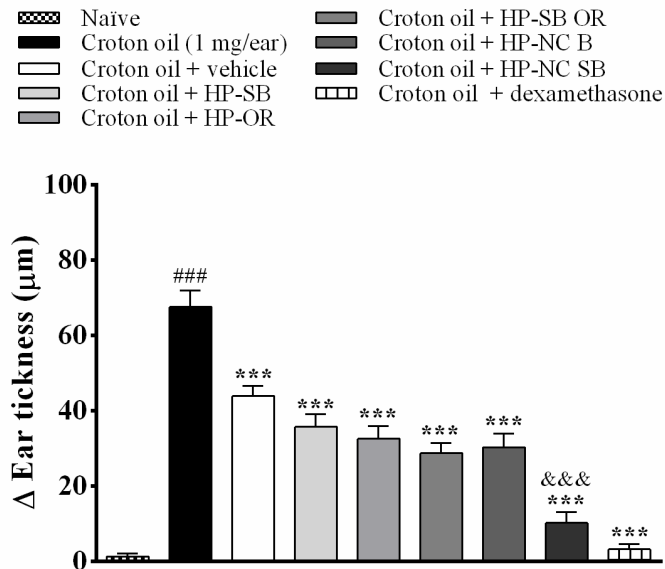
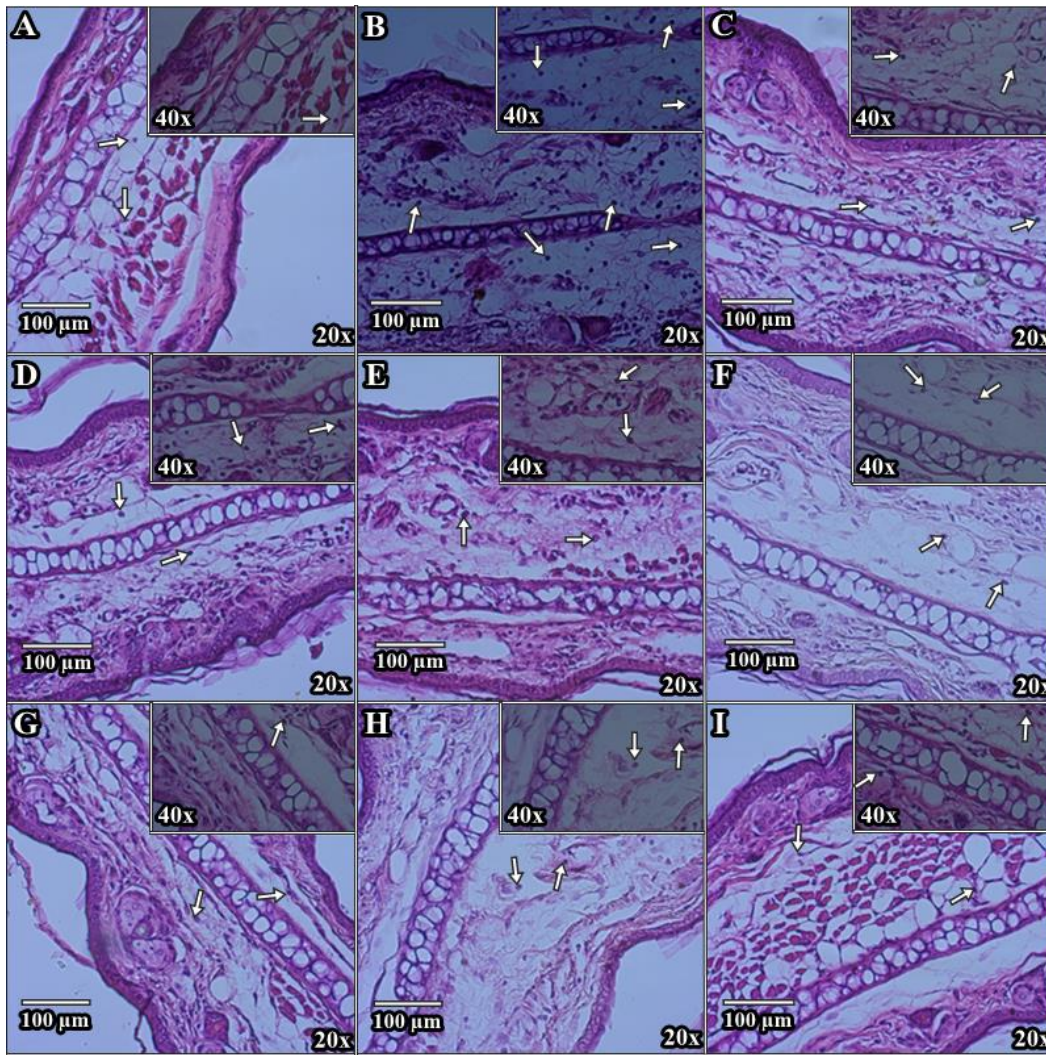


Figure 4. Antiedematogenic effect of semisolid formulations on croton-oil induced skin inflammation in mice. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after croton oil application. Ear edema was measured at 6 h after croton oil administration. Each bar represents the mean + SEM ($n = 6-8$); ### $p < 0.001$ shows significant difference when compared to the naïve group. *** $p < 0.001$ shows significant difference when compared to the untreated group (croton oil). &&& $p < 0.001$ shows significant difference when compared with HP-NC SB and HP-NC B groups. One-way Anova followed by post hoc Newman-Keuls test.



- ▨ Naive
- Croton oil (1 mg/ear)
- Croton oil + vehicle
- ▤ Croton oil + HP-SB
- ▥ Croton oil + HP-OR
- ▧ Croton oil + HP-SB OR
- ▨ Croton oil + HP-NC B
- ▩ Croton oil + HP-NC SB
- Croton oil + dexamethasone

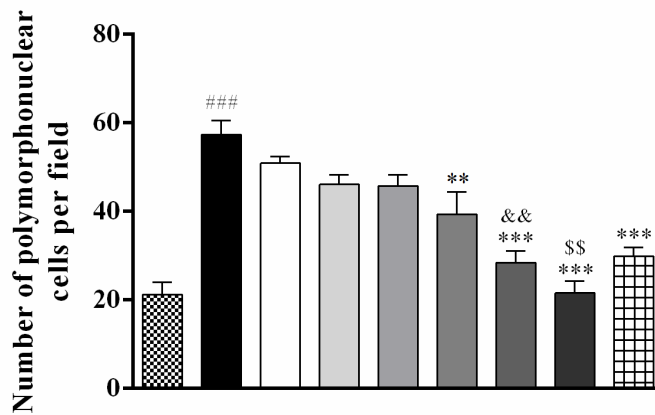


Figure 5. Effect of the topical semisolid formulations on cell infiltration croton oil-induced. Ear representative light microphotography (arrows indicate

polymorphonuclear cells) and quantification of polymorphonuclear cells per field of the ear tissue of mice at 6 h after croton oil application or croton oil plus treatments. Each bar represents the mean \pm SEM ($n = 6-8$); ### $p < 0.001$ shows significant difference when compared to the naïve group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ shows significant difference when compared to the untreated group. && $p < 0.01$ shows significant difference when compared with HP-OR group; \$\$ $p < 0.01$ shows significant difference when compared to HP-SB OR group. One-way Anova followed by post hoc Newman-Keuls test.

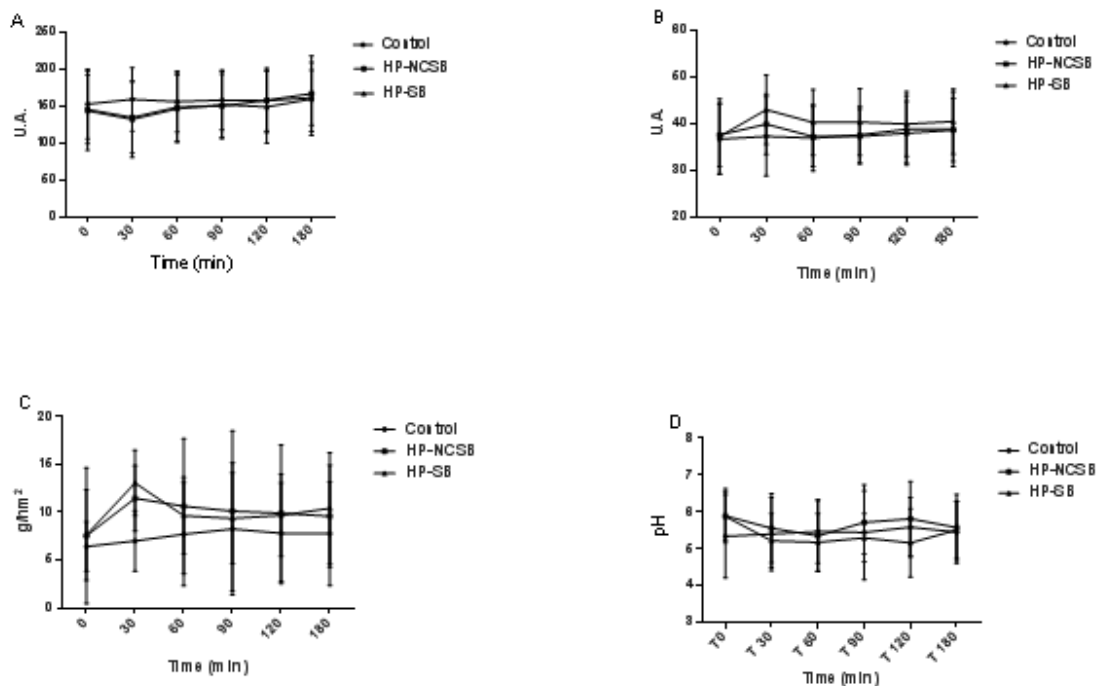


Figure 6. Graphical representation of the biometric parameters. (A) erythema; (B) moisture content of the stratum corneum; (C) transepidermal water loss; (D) Skin pH. Average \pm standard deviation, $n = 15$, repeated measure Anova followed by *Tukey* post-test).