

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO DITRANOL E SUA INCORPORAÇÃO EM
FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA DE BASE AQUOSA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Luiza Savian

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
DITRANOL E SUA INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO
SEMISSÓLIDA DE BASE AQUOSA**

Ana Luiza Savian

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO DITRANOL
E SUA INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA DE
BASE AQUOSA**

elaborada por
Ana Luiza Savian

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiane de Bona da Silva, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Scheila Rezende Schaffazick (UFSM)

Marta Palma Alves (Unifra)

Santa Maria, 04 de setembro de 2012

*Aos meus pais e minha irmã,
pelo amor, carinho, apoio, caráter,
confiança e compreensão
que sempre me foram dados.*

*“Se teus sonhos não te assustam, não são grandes o suficiente.”
Autor desconhecido*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria por todas as oportunidades oferecidas de conhecimento e de crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela realização deste trabalho.

À Prof. Cris pela orientação e dedicação, pelo exemplo de profissional que sempre demonstra, pelo apoio, pela compreensão, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, pela paciência.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e confiança, pelo apoio financeiro, por acreditarem sempre em mim, no meu trabalho e na minha capacidade.

À IC Daiane, que amadureceu comigo e com este trabalho, que sempre mostrou dedicação e interesse no andamento das análises, que sempre buscou e se tornou fundamental na execução deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que sempre se mostraram solícitos quando necessitei de informações e consultas.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de participação como membro discente, pela oportunidade de conhecimento e amadurecimento na área profissional e pessoal.

Ao departamento de Farmácia Industrial pela infra-estrutura oferecida.

À minha irmã Cristina, que sempre estive comigo quando necessitei de apoio, carinho e atenção.

Ao Fernando, pelo carinho, força, compreensão e apoio nos últimos meses deste trabalho.

À Fernanda, pela amizade, por todos os momentos de angústia divididos, pelo alto astral, pelos momentos de alegria, de apoio e pelo companheirismo.

Às colegas de mestrado Andréia e Friba, que sempre me ofereceram mão de obra qualificada, além de conversas, apoio e bons momentos de convivência e descontração.

À Julia Weber pela ajuda nos ensaios com hidrogéis e Mariana pelo ensaio de fotodegradação.

Aos demais alunos do Laboratório de Farmacotécnica pelo auxílio nas atividades, ajudando a tornar os dias de trabalho mais felizes e agradáveis.

Aos meus amigos, que estão sempre me acompanhando e torcendo por mim.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO DITRANOL E SUA INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA DE BASE AQUOSA

AUTORA: Ana Luiza Savian
ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de setembro de 2012.

O ditranol é um fármaco muito eficaz no tratamento tópico da psoríase. Entretanto, apresenta alguns efeitos adversos, como irritação e manchas na pele que dificultam sua utilização e adesão dos pacientes ao tratamento. Sua instabilidade frente à luz, altos valores de pH, metais e a presença de oxigênio, configuram, também, um passo limitante para o seu uso. Desta forma, a inclusão do fármaco em nanocarreadores constituiu o principal objetivo deste trabalho. Nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo 0,5 mg/mL de ditranol e 0,05% de EDTA ou 0,02% de ácido ascórbico foram preparadas pelos métodos de deposição interfacial do polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente, e avaliadas em relação as suas características físico-químicas (teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, pH, diâmetro médio de partícula, polidispersão e potencial zeta). As nanocápsulas, após preparação, apresentaram características satisfatórias: teor de fármaco próximo ao teórico, eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100%, diâmetro de partícula na faixa nanométrica (220-250 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,25, potencial zeta negativo e valores de pH de 5,6 a 4,4. Ao contrário, um baixo teor de fármaco foi verificado para as nanoemulsões (aproximadamente, 80%) após preparação. No estudo de fotodegradação frente à luz UVA se observou uma maior estabilidade do fármaco nas nanocápsulas em comparação à solução do fármaco livre ($t_{1/2} = 4$ e 1 hora para a nanocápsula e solução do fármaco livre contendo EDTA, respectivamente; $t_{1/2} = 17$ e 7,5 horas para a nanocápsula e solução do fármaco livre contendo ácido ascórbico, respectivamente). O ensaio de irritação pelo método de HET-CAM foi realizado para a avaliação da segurança das formulações. A partir dos resultados verificou-se que a encapsulação do fármaco diminuiu sua toxicidade em relação aos efeitos observados para o fármaco livre. Posteriormente, hidrogéis contendo as nanocápsulas foram preparados empregando-se Carbopol[®] 940 e Aristoflex[®] AVC como polímeros formadores de gel. As formulações semissólidas desenvolvidas apresentaram propriedades adequadas para a aplicação tópica e maior estabilidade quando comparadas às suspensões de nanocápsulas e ao hidrogel contendo o fármaco livre. Além disso, uma maior estabilidade do ditranol foi verificada para os hidrogéis preparados com Aristoflex[®] AVC.

Palavras-chave: Ditranol. Nanocápsulas. Estabilidade. Irritação. Hidrogéis. Psoríase.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULES CONTAINING DITHRANOL AND ITS INCORPORATION IN AQUEOUS BASED SEMISOLID FORMULATION

AUTHOR: Ana Luiza Savian
ADVISER: Cristiane de Bona da Silva
Place and Date of Defense: Santa Maria, September 04, 2012.

Dithranol is very effective drug for the topical treatment of psoriasis. However, it has some adverse effects, such as irritation and stain in the skin that difficult its application and patient adherence to treatment. Its instability to light, high pH values, metals and the presence of oxygen, configure as a limiting step for use. So, the inclusion of drug in nanocarriers was the main objective of this work. Lipid core nanocapsules and nanoemulsions containing 0.5 mg/mL of dithranol and 0.05% of EDTA or 0.02% of ascorbic acid were prepared by interfacial deposition of preformed polymer and spontaneous emulsification methods, respectively, and evaluated in relation to its physicochemical characteristics (drug content, encapsulation efficiency, pH, mean size, polydispersity index and zeta potential). The nanocapsules, after preparation, showed satisfactory characteristics: drug content near to the theoretical concentration, encapsulation efficiency about 100%, nanometric mean size (220-250 nm), polydispersity index below 0.25, negative zeta potential, and pH values from 5.6 to 4.4. Instead, low drug content was verified for the nanoemulsions (approximately 80%) after preparation. In photodegradation study against UVA light it was observed a higher stability of the dithranol-loaded nanocapsules comparing to solution containing the free drug ($t_{1/2} = 4$ and 1 h for nanocapsule and free drug solution containing EDTA, respectively; $t_{1/2} = 17$ and 7,5 h for nanocapsule and free drug solution containing ascorbic acid, respectively). Irritation test by HET-CAM method was conducted to evaluate the safety of the formulations. From the results it was found that nanoencapsulation of the drug decreased its toxicity compared to the effects observed for free drug. Subsequently, hydrogels containing nanocapsules were prepared employing Carbopol[®] 940 and Aristoflex[®] AVC as gel-forming polymers. The semisolid formulations showed suitable properties for topical application and higher stability when compared to nanocapsules suspensions and the hydrogel containing the free drug. Furthermore, a higher stability of dithranol was verified for hydrogels prepared with Aristoflex[®] AVC.

Keywords: Dithranol. Nanocapsules. Stability. Irritation. Hydrogels. Psoriasis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 – Estrutura química do ditranol.....	26
---	----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA 2 – Distribuição do tamanho de partícula das nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo ditranol (0,5 mg/mL), analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) DIT-NC _{EDTA} , (B) DIT-NC _{AA} , (C) DIT-NE _{EDTA} e (D) DIT-NE _{AA}	59
FIGURA 3 – Distribuição do tamanho de partícula das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol (0,5 mg/mL) analisadas por difração a laser. (A) DIT-NC _{EDTA} e (B) DIT-NC _{AA}	59
FIGURA 4 – Tamanho de partícula das nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC _{EDTA} e DIT-NC _{AA}) e nanocápsulas brancas (NC _{EDTA} e NC _{AA}) durante o estudo de estabilidade.....	63
FIGURA 5 – Índices de polidispersão de nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC _{EDTA} e DIT-NC _{AA}) e nanocápsulas brancas (NC _{EDTA} e NC _{AA}) durante o estudo de estabilidade.....	63
FIGURA 6 – Potencial zeta de nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC _{EDTA} e DIT-NC _{AA}) e brancas (NC _{EDTA} e NC _{AA}) durante o estudo de estabilidade.....	64
FIGURA 7 – Percentual de fotodegradação de ditranol livre em solução de acetonitrila:água (DIT-S); solução de acetonitrila:água e EDTA (DIT-S _{EDTA}) e nanocápsulas contendo ditranol e EDTA (DIT-NC _{EDTA}).....	70
FIGURA 8 – Percentual de fotodegradação de ditranol livre em solução de acetonitrila:água e ácido ascórbico (DIT-S _{AA}) e nanocápsulas contendo ditranol e ácido ascórbico (DIT-NC _{AA}).....	71
FIGURA 9 – Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Carbopol [®] 940 em relação a taxa de cisalhamento (s ⁻¹).....	81

FIGURA 10 – Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC em relação a taxa de cisalhamento (s ⁻¹).....	82
FIGURA 11 – Reogramas dos hidrogéis de Carbopol [®] 940.....	82
FIGURA 12 – Reogramas dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC.....	83
FIGURA 13 – Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Carbopol [®] 940 em função do peso adicionado (g).....	87
FIGURA 14 – Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC em função do peso adicionado (g).....	87
FIGURA 15 – Concentração de ditranol (mg/g) em função do tempo verificadas no estudo de estabilidade do ditranol em hidrogéis contendo nanocápsulas (HGC-DIT-NC _{EDTA} , HGA-DIT-NC _{EDTA} e HGA-DIT-NC _{AA}) e o fármaco livre (HGC-DIT _{EDTA} , HGA-DIT _{EDTA} e HGA-DIT _{AA}), obtidos por CLAE (média ± s).....	89

APÊNDICES

FIGURA 1 – Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE. (A) solução de ditranol em acetonitrila (20 µg/mL); (B) DIT-NC _{EDTA} (20 µg/mL); (C) NC _{EDTA} ; (D) DIT-NC _{AA} (20 µg/mL) e (E) NC _{AA}	112
FIGURA 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE no estudo de fotodegradação do ditranol: (A) Nanocápsulas de ditranol e EDTA no tempo zero e (B) após 5 horas de exposição; (C) nanocápsulas de ditranol e ácido ascórbico no tempo zero e (D) após 24 horas de exposição à luz UVA.....	113
FIGURA 3 – Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE. (A) HGC-DIT-NC _{EDTA} (20 µg/mL); (B) HGC-NC _{EDTA} ; (C) HGA-NC _{EDTA} e (D) HGA-NC _{AA}	114

LISTA DE TABELAS

PARTE EXPERIMENTAL

TABELA 1 – Composição qualitativa e quantitativa das nanoemulsões e nanocápsulas (n = 3).....	42
TABELA 2– Classificação do potencial de irritação de acordo com o teste de HET-CAM.....	47
TABELA 3 – Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Carbopol® 940 contendo nanocápsulas de ditranol e EDTA (HGC-DIT-NC _{EDTA}), nanocápsulas brancas de EDTA (HGC-NC _{EDTA}), ditranol livre (HGC-DIT) e hidrogel base (HGC _{EDTA}).....	50
TABELA 4– Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Aristoflex® AVC contendo nanocápsulas de ditranol e EDTA (HGA-DIT-NC _{EDTA}); nanocápsulas brancas de EDTA (HGA-NC _{EDTA}); ditranol livre (HGA-DIT _{EDTA}) e hidrogel base (HGA _{EDTA}).....	50
TABELA 5 – Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Aristoflex® AVC contendo nanocápsulas de ditranol e ácido ascórbico (HGA-DIT-NC _{AA}); nanocápsulas brancas de ácido ascórbico (HGA-NC _{AA}); ditranol livre (HGA-DIT _{AA}) e hidrogel base (HGA _{AA}).....	51

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 6 – Caracterização físico-química das nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo ditranol (0,5 mg/mL) após preparação: DIT-NC _{EDTA} , NC _{EDTA} , DIT-NE _{EDTA} e NE _{EDTA} – nanocápsulas contendo ditranol, nanocápsulas brancas, nanoemulsão contendo ditranol e nanoemulsão branca com EDTA, respectivamente; DIT-NC _{AA} , NC _{AA} , DIT-NE _{AA} e NE _{AA} – nanocápsulas contendo ditranol, nanocápsulas brancas, nanoemulsão contendo ditranol e nanoemulsão branca com ácido ascórbico, respectivamente; DIT-NC – nanocápsulas de ditranol sem antioxidantes (média ± s).....	58
TABELA 7 – Estabilidade das nanocápsulas contendo ditranol (0,5 mg/mL) e EDTA: caracterização físico-química após 15 dias de armazenamento a temperatura ambiente e proteção da luz (DIT-NC _{EDTA} – nanocápsulas contendo ditranol e EDTA; NC _{EDTA} – nanocápsulas brancas de EDTA; média ± s).....	65
TABELA 8 – Estabilidade das nanocápsulas contendo ditranol (0,5 mg/mL): caracterização físico-química após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente e proteção da luz (DIT-NC _{AA} – nanocápsulas contendo ditranol e ácido ascórbico; NC _{AA} – nanocápsulas brancas e ácido ascórbico; média ± s).....	66

TABELA 9 – Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade do ditranol em nanocápsulas contendo EDTA (DIT-NC _{EDTA}), solução de acetonitrila:água com EDTA (DIT-S _{EDTA}) e solução de acetonitrila:água (DIT-S), obtidos por CLAE (média ± s).....	69
TABELA 10 – Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade do ditranol em nanocápsulas contendo ácido ascórbico (DIT-NC _{AA}) e solução de acetonitrila:água com ácido ascórbico (DIT-S _{AA}), obtidos por CLAE (média ± s).....	70
TABELA 11 – Parâmetros de velocidades de reação (k), tempo de meia-vida e correlação para ditranol em solução acetonitrila:água (DIT-S e DIT-S _{EDTA}) e nanocápsulas (DIT-NC _{EDTA}) após fotodegradação.....	73
TABELA 12 – Parâmetros de velocidades de reação (k), tempo de meia-vida e correlação para ditranol em solução acetonitrila:água (DIT-S _{AA}) e nanocápsulas (DIT-NC _{AA}) após fotodegradação.....	73
TABELA 13 – Valores de pH e teor obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de ditranol (HGC-DIT-NC _{EDTA} , HGA-DIT-NC _{EDTA} e HGA-DIT-NC _{AA}); nanocápsulas brancas (HGC-NC _{EDTA} , HGA-NC _{EDTA} eHGA-NC _{AA}); fármaco livre (HGC-DIT _{EDTA} , HGA-DIT _{EDTA} e HGA-DIT _{AA}) e hidrogéis base (HGC _{EDTA} , HGA _{EDTA} e HGA _{AA}) (média ± s).....	79
TABELA 14 – Determinação do diâmetro médio e da polidispersão dos hidrogéis contendo nanocápsulas de ditranol (HGC-DIT-NC _{EDTA} , HGA-DIT-NC _{EDTA} e HGA-DIT-NC _{AA}) e nanocápsulas brancas (HGC-NC _{EDTA} , HGA-NC _{EDTA} eHGA-NC _{AA}) (média ± s)...	80
TABELA 15 – Coeficientes de regressão (r ²) obtidos na modelagem matemática dos hidrogéis para descrever as curvas de tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento (média ± s).....	84
TABELA 16 – Valores de índice de fluxo (n), índice de consistência (k) e fator de espalhabilidade (FE) calculados para os hidrogéis de Carbopol [®] 940 (média ± s).....	84
TABELA 17 – Valores de viscosidade (η), valor de cedência (τ ₀) e fator de espalhabilidade (FE) calculados para os hidrogéis de Aristoflex [®] AVC (média ± s).....	85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVO.....	19
1.1 Objetivo Geral.....	19
1.2 Objetivos Específicos.....	19
REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Psoríase.....	21
2.1.2 Tratamento da psoríase.....	24
2.2 Ditranol.....	25
2.3 Administração cutânea e nanopartículas poliméricas.....	33
PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Materiais.....	39
3.1.1 Matérias-primas.....	39
3.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	39
3.1.3 Solventes e outros materiais.....	40
3.2 Métodos.....	40
3.2.1 Preparação das nanoestruturas.....	40
3.2.2 Caracterização físico-química das nanoestruturas.....	42
3.2.2.1 Determinação do pH.....	42
3.2.2.2 Determinação do diâmetro médio e da polidispersão.....	43
3.2.2.3 Determinação do potencial zeta.....	43
3.2.2.4 Determinação do teor de ditranol nas formulações.....	43
3.2.2.4.1 Validação do método analítico.....	44
3.2.2.5 Determinação da eficiência de encapsulamento.....	45
3.2.3 Avaliação do potencial de irritação das nanocápsulas	46
3.2.4 Estudos de estabilidade.....	47

3.2.4.1 Estabilidade a temperatura ambiente.....	47
3.2.4.2 Fotodegradação.....	48
3.2.5 Preparação de formulações semissólidas.....	48
3.2.6 Caracterização físico-química dos hidrogéis.....	51
3.2.6.1 Determinação do pH.....	51
3.2.6.2 Determinação do teor de ditranol nos hidrogéis.....	52
3.2.6.3 Determinação do diâmetro médio das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis.....	52
3.2.6.4 Avaliação das propriedades reológicas.....	52
3.2.6.5 Avaliação da espalhabilidade.....	53
3.2.7 Análise estatística.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4 Resultados e discussão.....	56
4.1 Caracterização físico-química das nanoemulsões e nanocápsulas contendo ditranol.....	56
4.1.1 Determinação do diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulamento.....	56
4.2 Estudos de estabilidade.....	62
4.2.1 Estabilidade frente ao armazenamento.....	62
4.2.2 Estudo de fotodegradação.....	68
4.3 Avaliação do potencial de irritação das nanocápsulas.....	75
4.4 Caracterização físico-química dos hidrogéis.....	77
4.4.1 Determinação do pH, teor, tamanho de partícula e polidispersão.....	77
4.4.2 Avaliação reológica e da espalhabilidade dos hidrogéis contendo as nanocápsulas de ditranol.....	81
4.5 Estabilidade dos hidrogéis.....	89
CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

APÊNDICES.....	112
Apêndice A – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do ditranol nas nanocápsulas.....	112
Apêndice B – Fotoestabilidade.....	113
Apêndice C – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do ditranol nos hidrogéis.....	114

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória da pele que afeta em torno de 3% da população mundial (RODRIGUES; TEIXEIRA, 2009). É uma doença epidérmica proliferativa crônica que, embora possa ocorrer em qualquer idade, inicia mais frequentemente na terceira década de vida (MARTINS; CHAUL, 2009). Um conjunto de fatores genéticos, imunológicos e ambientais é necessário para o desenvolvimento da doença. Entretanto, seus antígenos ainda não são conhecidos, mas o papel das infecções bacterianas no desenvolvimento da psoríase na infância sugere que fatores ambientais possam induzir resposta imunitária capaz de gerar lesões da psoríase. O estresse em sentido amplo (psicológico, físico ou cirúrgico) é um agente desencadeante ou agravante bem conhecido, assim como certos medicamentos (BERARD; NICOLAS, 2003).

O tratamento da doença requer a utilização de fármacos administrados sistemicamente ou de uso tópico, dependendo da gravidade das lesões. A administração do medicamento diretamente sobre a lesão cutânea permite minimizar possíveis efeitos colaterais do tratamento em outros órgãos e na pele não lesada (MARTINS; CHAUL, 2009). Além disso, é a principal forma de controlar o avanço das lesões (80% dos portadores). Entretanto, apesar de serem muito efetivas, muitas terapias tópicas têm sido associadas à baixa adesão ao tratamento, que, em geral, é atribuída aos efeitos adversos das substâncias utilizadas (REICH; BEWLEY, 2011).

Desde a sua descoberta, há mais de 80 anos atrás, o ditranol, também chamado de antralina, tem sido um dos mais efetivos fármacos no tratamento tópico para a psoríase, mas seus efeitos adversos, como irritação e manchas na pele e roupas, restringem seu uso. O ditranol se apresenta na forma de pó cristalino, amarelo e inodoro. É instável e sofre oxidação espontânea, dando lugar à formação de monômeros e dímeros de quinona. Sua oxidação é favorecida pela luz visível e ultravioleta, presença de oxigênio, aumento da temperatura e soluções alcalinas (PALMA, 2003).

O fármaco é indicado na psoríase em placas, ungueal e do couro cabeludo, sendo contraindicado nas formas eritodérmica e pustulosa. No Brasil, pela falta de produtos industrializados, é comercializado em preparações magistrais como cremes e pomadas (MARTINS; CHAUL, 2009), requerendo alguns cuidados durante a manipulação e o armazenamento. Além disso, os veículos convencionais possuem capacidade limitada para a

solubilização do ditranol, sendo necessária a incorporação de uma quantidade adicional de fármaco para manter a concentração desejada no sítio receptor. A insolubilidade do fármaco nos veículos, e com isso, seu acúmulo nas lesões psoriásicas e distribuição não controlada no local de ação, levam a reações de irritação e comprometimento da pele normal (AGARWAL et al., 2002). O ditranol produz resposta inflamatória dose-dependente na pele, sendo a concentração eficaz próxima da concentração irritante (MARTINS; CHAUL, 2009).

Os sistemas nanoestruturados tem sido alvo de importantes estudos no sentido de aperfeiçoar a liberação de substâncias em um determinado local, atuando como um sistema carreador de fármacos, propiciando uma maior e melhor distribuição do ativo no local de ação e o direcionamento deste ao seu sítio específico (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). Dentre esses nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas são apontadas como uma alternativa viável para alterar a farmacocinética e a biodistribuição de fármacos através da pele. Além disso, o seu emprego em formulações tópicas garante a proteção da área afetada frente à toxicidade do ativo, prevenindo ou reduzindo possíveis reações de irritação. Este efeito protetor ocorre devido à diminuição do contato direto do ativo com a região alvo, além do uso de concentrações menores do fármaco (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

No caso específico do ditranol, poucos trabalhos relatam a sua associação com nanocarreadores com o intuito de reduzir seus efeitos adversos. Guenther, Smirnova e Neubert (2008) estudaram a associação do fármaco em lipossomas e a inclusão destes em gel; Agarwal e colaboradores (2002) avaliaram a inclusão do ditranol em lipossomas e niossomas, bem como sua liberação *in vitro* em pele de ratos; nanopartículas lipídicas sólidas contendo ditranol foram obtidas por Carlotti e colaboradores (2009) e estudos de fotoestabilidade foram conduzidos em diferentes formulações.

Considerando a potencialidade dos sistemas nanoestruturados em aumentar a eficácia de determinadas substâncias, aliado a possibilidade de aumentar a estabilidade físico-química de alguns compostos, este trabalho foi delineado no sentido de estudar a obtenção de formulações nanotecnológicas (nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões) contendo ditranol como via alternativa para o tratamento tópico da psoríase, visando a sua maior estabilidade e segurança em relação as suas formas farmacêuticas já conhecidas. Cabe salientar que até o presente, não há estudos que demonstrem a associação deste fármaco em nanopartículas poliméricas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo ditranol para posterior incorporação em preparações dermatológicas semissólidas, visando sua aplicação no tratamento tópico da psoríase, na tentativa de aumentar sua estabilidade e segurança.

1.2 Objetivos Específicos

- Preparação e caracterização físico-química de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo ditranol;
- Avaliação da estabilidade do fármaco quando associado aos nanocarreadores em temperatura ambiente e na presença de luz UVA;
- Avaliação do potencial de prevenção das nanocápsulas contendo o fármaco frente à fotodegradação;
- Avaliação *in vitro* do potencial de irritação do fármaco nanoencapsulado;
- Preparação e avaliação das características físico-químicas de formas farmacêuticas semissólidas obtidas a partir das nanocápsulas contendo o fármaco em estudo;
- Avaliação da estabilidade do ditranol nas nanocápsulas incorporadas à hidrogéis de Carbopol[®] 940 e Aristoflex[®] AVC.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Psoríase

Apesar de pouco conhecida, a psoríase é uma doença crônica inflamatória da pele que acomete igualmente homens e mulheres, sendo uma das dermatoses mais frequentemente relatadas (TALHARI; RAMOS, 2006). No século XIX, se acreditava que a psoríase era um processo de regulação anormal do crescimento dos queratinócitos ou de origem inflamatória; entretanto, em 1970, testes imunológicos com células envolvidas neste processo indicaram a participação de células sanguíneas nesta doença. Mais tarde, em 1982, descobriu-se que as células T desempenhavam um importante papel nas lesões causadas pela psoríase, o que levou a conclusão que se tratava de uma desordem imunológica (BOS; RIE, 1999). Assim, a ativação do sistema imune que deveria proteger e remover antígenos do organismo passa a produzir um processo inflamatório crônico na pele (GALADARI; SHARIF; GALADARI, 2005). A doença é crônica, recorrente e frequentemente benigna. Embora não haja cura, há várias possibilidades terapêuticas para o seu controle (ARRUDA; CAMPBELL; TAKAHASHI, 2001).

Ainda na antiguidade, foi Hipocrates (460-377 a.C.) ou Galeno (129-99 a.C) quem utilizou a palavra *psora* (em grego = prurido) para descrever o que hoje se reconhece como psoríase. O termo englobava outras enfermidades, como a lepra e os eczemas. Robert Willan (1757-1812) distinguiu a psoríase da verdadeira lepra, subdividindo-a em dois tipos, mas ainda utilizando uma nomenclatura confusa: *lepra graecorum* e *psora leprosa*, até que Von Hebra (1816-1880) unificou a terminologia para psoríase e a enfermidade foi definitivamente individualizada (SILVA, 2009).

A lesão da psoríase, sendo ela uma única pápula ou uma extensa placa, se caracteriza por eritema, escamação e pápula (TALHARI; RAMOS, 2006), e apesar de qualquer região corporal ser atingida, uma tendência maior de acometimento ocorre nos joelhos, cotovelos, pés, mãos, couro cabeludo e genitália. As unhas também podem ser afetadas, além das articulações (psoríase artropática) (ASHCROFT; LIWAN PO; GRIFFITHS, 2000). As escamas da psoríase são secas e de cor esbranquiçada, e apresentam-se em lâminas superpostas, que ao serem destacadas, desfazem-se em fragmentos estratificados. Essas

escamas, ao serem removidas, evidenciam pontos sangrantes (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; TAKAHASHI, 2009). O eritema é vermelho vivo ou claro, na maioria das lesões, e mais intenso quando a escamação está ausente ou diminuída. A face é relativamente poupada nos adultos, embora possa ser acometida em formas extensas, simulando dermatite seborreica (LANGLEY; KRUEGER; GRIFFITHS, 2005).

A forma vulgar corresponde a 80% ou mais dos casos (MENTER et al., 2004). É caracterizada por pápulas e placas escamosas e infiltradas, distribuídas simetricamente, afetando, preferencialmente, o couro cabeludo, os joelhos, a região lombo-sacral e os cotovelos (SAMPAIO; RIVITTI, 2007). A psoríase pode apresentar comprometimento ungueal e articular em 5 a 20% dos indivíduos acometidos. (SCHON; HENNING, 2005; KORMEILI; LOWE; YAMACHI, 2004). Podem ocorrer lesões da matriz ungueal ou da lâmina ungueal (REICH, 2009).

O diagnóstico da psoríase clássica, em geral, é fácil e se baseia em elementos macromorfológicos que, na maioria das vezes, são típicos como o eritema, a infiltração e a escama, além da história clínica de lesões recorrentes ao longo de muitos anos (SILVA, 2009).

A idade de início do quadro é bimodal, ou seja, um pico de incidência na segunda década de vida e outro na quinta década, com associação a antígenos de histocompatibilidade distintos (ARRUDA; CAMPBELL; TAKAHASHIMI, 2001). A psoríase tipo I ou de início precoce apresenta tendência à disseminação, maior número de recorrências, maior frequência de história familiar e dos marcadores HLA-Cw6 e DR7, quando comparada à psoríase tipo II ou de início tardio (durante ou após a quinta década de vida) (CHRISTOPHERS, 2001).

A patogênese da doença ainda não é totalmente esclarecida. O desencadeamento da doença pode iniciar por fatores ambientais (trauma físico), infecções (HIV, streptococco β -hemolítico), uso de alguns fármacos (lítio, β -bloqueadores, cloroquina, mepacrina), estresse fisiológico e por fatores genéticos, já que 85% dos pacientes com psoríase apresentam o marcador HLA-Cw6. A diferença entre esses fatores no processo da doença ainda não foi esclarecido (ASHCROFT; LIWAN PO; GRIFFITHS, 2000).

As evidências da participação do sistema imunológico na patogênese da psoríase são fortemente sugeridas pelo desenvolvimento da doença em receptores de transplante de medula óssea de doador com psoríase. Assim como pela melhora da doença, quando é seguida de transplante de medula óssea de doador sem psoríase, e também pelo sucesso nos tratamentos com inibidores de TNF- α , ciclosporina e metotrexato (SCHON; HENNING, 2005; LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007; LOWES et al., 2008). Tais observações contrariam o

pensamento prevalente na década de 70 de que a doença teria como causa a hiperproliferação e alteração na diferenciação de queratinócitos (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007).

A associação da psoríase com antígenos de histocompatibilidade fica ainda mais clara com a descoberta do PSORS1, gene localizado no cromossomo 6 (6p21) e identificado em muitos casos da doença. Neste cromossomo está localizada a maioria dos genes do complexo principal de histocompatibilidade e outros desta região, associados a outras doenças autoimunes (LANGLEY; KRUEGER; GRIFFITHS, 2005).

A resposta imunológica anormal é responsável pelo dano tecidual que resulta em disfunção dos queratinócitos. A atividade mitótica dos queratinócitos basais é aumentada em mais de 50 vezes na pele psoriática, o que reduz de 28 a 30 dias para 3 a 5 dias o tempo de migração destes da camada basal até a córnea (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007).

Acredita-se que, devido à presença de linfócitos T tipo 1 na fase inicial da doença, e a resposta positiva às terapias com alvo nas células T, estas células estejam envolvidas neste processo (RODRIGUES; TEIXEIRA, 2009). Alterações como diferenciação anormal de queratinócitos e hiperproliferação, infiltração das células inflamatórias e proliferação vascular são os fenômenos a nível celular que acometem pacientes com psoríase. A proliferação de queratinócitos da epiderme resulta da liberação de citocinas produzidas pelos leucócitos ativados por células T (ORTONNE, 1996).

O impacto da psoríase na qualidade de vida dos pacientes pode resultar em estresse diário e morbidez fisiologia (BASAVARAJ; NAVYA; RASHMI, 2011). Falta de autoconfiança, discriminação, isolamento, raiva e desesperança também são sentimentos muito comuns em pacientes com a doença. A psoríase afeta significativamente as atividades diárias e, aproximadamente, dois terços dos pacientes reportam que ela afeta negativamente o seu dia-a-dia (WEISS et al., 2002). Os sintomas físicos das lesões da pele, como intensa coceira, descamação, vermelhidão, ressecamento, impermeabilidade e sangramento, podem afetar a funcionalidade física do paciente e, conseqüentemente, sua qualidade de vida (YOSIPOVITCH et al., 2000). Não se encontrou correlação entre a severidade da doença e a presença de prurido intenso. Entretanto, a prurido intenso está intimamente ligada com a qualidade de vida dos pacientes, sentimentos de segregação, estresse e sintomas depressivos (REICH; HREHOROW; SZEPIETOWSKI, 2010). Maiores reações de estresse também são relacionadas com o aparecimento da doença em idades mais precoces (NIEMEIER; NIPPESEN; KUPFER, 2002).

Quando a psoríase envolve a palma das mãos e a sola dos pés, que acomete em torno de 40% dos portadores, a dor e o desconforto são maiores do que nos pacientes que não tem

essas regiões acometidas. Atividades rotineiras como escovar os dentes ou trocar de roupa ficam comprometidas (PETTEY; BALKRISHNAN; RAPP, 2003).

As lesões da psoríase quando são visíveis causam preconceito e rejeição da sociedade para com os pacientes acometidos. As pessoas em geral não tem muito conhecimento sobre a doença e pensam no contágio. Isto pode levar os portadores a evitar lugares públicos, como piscinas, ginásios, salões de beleza, lugares em que estas situações de rejeição possam ocorrer, comprometendo, assim, a vida social do paciente (GINSBURG; LINK, 1993). Em torno de 6% dos trabalhadores avaliados em um estudo relatam que sofrem ou já sofreram alguma discriminação devido à doença, e 23% dizem que a doença influenciou na sua escolha de carreira (WEISS et al., 2002). Além disso, estudos mostram que o baixo nível de consciência e a incompreensão das pessoas não portadoras da psoríase podem contribuir para a falta de sensibilidade e entendimento para com os portadores na sociedade (YOUNG, 2005).

2.1.2 Tratamento da psoríase

Os tratamentos disponíveis para a psoríase devem ser prescritos levando-se em consideração a forma clínica, a localização das lesões, a gravidade da doença, as necessidades e as limitações do paciente. A abordagem terapêutica inclui a administração tópica e/ou sistêmica de medicamentos, fototerapia ou combinações entre eles. De qualquer forma, devido à cronicidade da doença e à rápida diminuição do efeito do fármaco, sistemas alternados de medicamentos devem ser estabelecidos (SILVA, 2009).

Os tipos de tratamentos empregados para a psoríase são supressivos e não curativos. Assim, o objetivo da terapia é minimizar a extensão e a severidade das lesões (ASHCROFT; LIWAN PO; GRIFFITHS, 2000). A remissão do quadro pode ocorrer, mas não costuma ser regra. Em geral, após o desencadeamento da doença, algum tipo de tratamento é necessário para o controle das lesões, nas quais, depois de controladas, faz-se o uso de tratamentos de manutenção (TALHARI; RAMOS, 2006). A extensão da doença, as áreas do corpo atingidas, a idade do paciente, o sexo, o estado de saúde em geral e o tratamento prévio são fatores que devem ser observados na escolha do fármaco ideal para o controle da doença (ASHCROFT; LIWAN PO; GRIFFITHS, 2000). A maioria dos pacientes quer estar envolvido com a escolha do tratamento, e esta decisão está diretamente ligada à satisfação do mesmo. A terapia sistêmica é indicada para as formas aguda e moderada a grave da psoríase, ou quando os

tratamentos locais não são suficientes para estabilizar as lesões (RENZI; DI PIETRO; TABOLLI; 2011).

A administração tópica de substâncias sobre a lesão cutânea permite minimizar possíveis efeitos colaterais da terapia oral (MARTINS; CHAUL, 2009). É indicada para pacientes com placas leves a moderadas, pois em casos de psoríase mais severa e extensa, a terapia tópica é impraticável ou não suficientemente efetiva (ASHCROFT; LIWAN PO; GRIFFITHS, 2000). Os cremes umectantes ou hidratantes devem ser incluídos em qualquer esquema terapêutico, inclusive nos períodos assintomáticos. Os queratolíticos, como o ácido salicílico, entram na composição de loções e cremes, normalmente associados a corticosteroides. Estes últimos têm sido a terapia tópica mais utilizada, apesar dos efeitos colaterais apresentados e a ocorrência de taquifilaxia (SILVA, 2009).

Dentre as substâncias utilizadas para tratamento tópico da psoríase se destacam os corticosteróides (propionato de clobetasol, dipropionato de betametasona, hidrocortisona, dexametasona), os análogos da vitamina D (calcipotriol, calcitriol), o alcatrão, os imunomoduladores (pimecrolimo, tacrolimo), os retinóides tópicos (tazaroteno) e o ditranol (ARRUDA; CAMPBELL; TAKAHASHIMI, 2001).

2.2 Ditranol

O ditranol (antralina) ou 1,8-dihidroxi-9-antrona (Figura 1) é um dos fármacos mais efetivos no tratamento da psoríase, sendo eficaz tanto na inflamação quanto na hiperproliferação causada pela doença. Sua descoberta iniciou com os estudos de Lieberman e Seidler (1878), os quais demonstraram que a planta *Andira araroba*, empregada para o tratamento tópico da psoríase, possuía como componente ativo a antrona (1,8-dihidroxi-3-metil-9-antrona). O ditranol foi a primeira substância sintética antipsoríase introduzida na Alemanha, em 1916, sob o nome de cignolina. Mais tarde, foi denominada ditranol na Europa e antralina nos Estados Unidos (MULLER, 1996). No Brasil, o fármaco fez parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) até o ano de 2002 (RENAME 2002), indicada na forma de pomada (0,1 a 0,2%), sendo excluída posteriormente (RENAME, 2006).

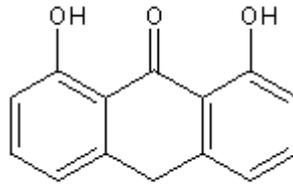


Figura 1 – Estrutura química do ditranol.

Caracteriza-se por ser um pó amarelo a marrom claro e cristalino, praticamente insolúvel em água, solúvel em cloreto de metileno, parcialmente solúvel em acetona e fracamente solúvel em etanol (96%). Seu ponto de fusão se encontra na faixa de 178 °C a 182 °C (BRITISH PHARMACOPEA, 2011).

Além da psoríase, o fármaco é utilizado para o tratamento de outras doenças que afetam a pele, como eczemas crônicos, dermatofitoses, alopecia aerata e dermatite seborreica. Seu prolongado tempo de remissão e a baixa taxa de recaídas são características favoráveis se comparado aos corticosteróides, que são associados a muitos efeitos colaterais locais e sistêmicos, grande número de recorrências, atrofia da pele e imunossupressão generalizada (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008). Van de Kerkhof e colaboradores (2006) realizaram um estudo comparativo do uso tópico do ditranol (administrado uma vez ao dia) e do calcipotriol (duas vezes ao dia). O resultado obtido foi de que houve uma maior remissão da doença com o grupo tratado com o ditranol. Cabe salientar que o calcipotriol tem sido muito utilizado no tratamento tópico da psoríase por não causar manchas na pele.

Topicamente, o ditranol penetra na pele pela barreira do estrato córneo comprometido pela doença em 30 minutos, e a sua maior concentração é encontrada na camada córnea. Em algumas formas da psoríase, torna-se necessário sua associação com um agente queratolítico, como o ácido salicílico, a fim de promover uma melhor distribuição no local de ação (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008). A adição de uréia também aumenta a concentração de ditranol na pele, em torno de 2,5 vezes (WOHLRAB, 1991). A sua absorção na pele sadia é menor do que na pele comprometida pela doença (WANG et al., 1987). Entretanto, não se observa efeitos adversos distintos entre a pele sadia e à comprometida com o uso do ditranol (PRINS et al., 1998; PARSLEW; FRIEDMANN, 1999). O que se verifica é uma maior gravidade na formação de eritema que é causado pelo ditranol quando ele se encontra associado em emulsões O/A se comparado a bases lipofílicas e, provavelmente, este efeito ocorre devido à liberação mais rápida do fármaco (KNECZKE et al., 1989).

A ação terapêutica do fármaco está relacionada à interação com o DNA e à inibição de enzimas associadas à proliferação e inflamação das células, ou a peroxidação e a destruição das membranas lipídicas (MULLER, 1996). Sua ação ocorre em nível celular, intracelular e intercelular, que inclui ácidos nucleicos, vários caminhos bioquímicos e imunomoduladores. Ainda, inibe a proliferação dos queratinócitos, ocorrendo a normalização da expressão da queratina. A taxa de renovação das células epidérmicas é diminuída, resultando no alívio dos sintomas da doença (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008).

A principal enzima que interage com o fármaco é a glicose-6-fosfatase (G-6-PDH), que é aumentada na psoríase e inibida pelo ditranol. Entretanto, o maior efeito parece ser a inibição da respiração mitocondrial. Desta forma, dois processos de inibição enzimática estão envolvidos: a pentose fosfato oxidativa e a glicólise oxidativa via ciclo do ácido cítrico (FUCHS et al., 1986; SALET et al., 1991).

A organela alvo do ditranol é a mitocôndria. McGill e colaboradores (2005) demonstraram através das propriedades fluorescentes do ditranol que ele se localiza nas mitocôndrias dos queratinócitos. Dessa forma, também atua na respiração celular, onde ocorre o seu acúmulo e a inibição da respiração pela sua interação com a cadeia transportadora de elétrons, resultando na redução da síntese de ATP. A diminuição de energia celular resulta na inibição de energia para alguns processos, como para a replicação do DNA (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008). Cabe salientar que a associação do fármaco com as membranas celulares é rápida (50% do fármaco se fixa às células nos 10 primeiros minutos de exposição) (REICHERT et al., 1985).

A taxa de reabsorção do ditranol no sangue é muito baixa (SCHAEFER; SCHALLA, SHROOT, 1981; WESTER et al., 1980). Pequenas quantidades são excretadas, predominantemente na urina como produtos de sua oxidação; entretanto, não se observa toxicidade sistêmica, particularmente no rim (NEILL et al., 1984; GOODFIELD; HULL; CUNLIFFE, 1994).

A molécula do ditranol rapidamente se oxida, gerando radicais livres que causam dano aos tecidos biológicos e irritam profundamente. Os tecidos não afetados pela doença quando estão em contato com o fármaco são os de maior reatividade (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008). Há evidências de que seus efeitos biológicos sejam decorrentes de reações redox, resultando na formação de radicais antrálicos (dantrona e dímero) e na produção de espécies reativas de oxigênio (CZERWINSKA et al., 2006). Estas espécies podem, também, ser responsáveis pelos seus efeitos indesejáveis, como irritação e manchas na pele e não são efetivos contra a psoríase (MULLER, 1996). O produto final da oxidação do ditranol

apresenta coloração marrom e é responsável pelas manchas de tons mais escuros que ocorrem na pele e roupas (KEMÉNY; RUZICKA; BRAUN-FALCO, 1990). Radicais de oxigênio são constantemente formados como bioprodutos de vários processos de transferência de elétrons, sendo úteis em alguns processos fisiológicos; porém, podem ser altamente destrutivos quando produzidos em excesso (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; GUTTERIDGE, 1993).

A oxidação do ditranol é dependente tanto do pH quanto da presença de luz. Metade de sua reatividade química pode ser atribuída aos grupos fenólicos hidroxil em C1 e C8 e aos dois átomos de hidrogênio em C10 (Figura 1). Sua auto-oxidação está relacionada com o metabolismo celular, importante para a sua atividade farmacológica, uma vez que atua como um doador de elétron e inibe a cadeia transportadora de elétrons. A cadeia de oxidação leva a formação de produtos não caracterizados, conhecidos como “ditranol marrom”, já mencionados anteriormente. Todos os produtos de oxidação do ditranol (dantrona, diantrona e ditranol marrom) não possuem atividade antipsoríase e são responsáveis pela maior parte dos efeitos colaterais associados à sua terapia. Assim, ocorre um paradoxo, onde a reatividade química do fármaco é necessária para sua atividade, sendo, ao mesmo tempo, indesejável, pois acarreta na formação de produtos de degradação irritantes e que causam manchas na pele e vestimentas (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008). Entretanto, se a estabilidade do ditranol for aumentada, os efeitos indesejáveis como irritação e manchas causadas indiretamente pelos seus produtos de degradação, seriam resolvidos concomitantemente (WANG; AMHERST, 1991).

Adicionalmente, o consumo de oxigênio pelas lesões da psoríase é duas vezes maior em relação à pele sadia. Além disso, na presença do fármaco, uma redução significativa no consumo de oxigênio na pele humana foi observada, especialmente quando exposta à radiação ultravioleta, sugerindo um aumento da geração de radicais livres na pele afetada quando comparada à pele sadia (RAAB, 1981). Cabe salientar que a pele exibe certo grau de transformação de ferro (*turnover*) e sua excreção é aumentada na psoríase, confirmando o mecanismo reportado anteriormente (TRENAM; BLAKE; MORRIS, 1992).

Além de causar irritação, queimação, manchas e necrose na pele normal e afetada, o ditranol é instável frente à luz, oxigênio, metais pesados, altos valores de pH e em meio aquoso (HILLER; CAMPBELL; SMEATON, 1995; THOMA; HOLZMAN, 1998) e, na presença destes fatores, facilmente se decompõe em dímeros de quinona que são inativos (MARTINS; CHAUL, 2009).

Conforme exposto, o fármaco também é responsável por causar manchas na pele, ao entorno das lesões, cabelos e unhas, as quais permanecem por um longo período, e em roupas,

sendo difícil a sua remoção. Após aplicação, a região afetada apresenta ressecamento, com coceira e queimação (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008).

Algumas patentes já foram publicadas na tentativa de melhorar a estabilidade do fármaco. Nestes trabalhos se observa a grande quantidade de estabilizantes utilizados nas formulações. Dentre eles, Wang (1991) desenvolveu géis com ditranol (1,5%), butilhidroxitolueno (BHT) (0,2%), ácido salicílico (0,2%), EDTA (0,1%), bissulfito de sódio (0,1%) e ácido ascórbico (1%), resultando em formulações mais estáveis. Na tentativa de diminuir os conservantes ácidos, Katare, Agarwal e Kumar (2008) prepararam sistemas vesiculares multilamelares contendo ditranol, na concentração de 0,5%, na tentativa de diminuir a dose, evitar a irritação e manchas, e facilitar a aplicação. Como antioxidante se utilizou o BHT (0,3%) e a formulação final foi preparada em gel de metilcelulose.

Wuis e colaboradores (1999) avaliaram a estabilidade de cremes com concentrações mais baixas de ditranol (0,1; 0,3 e 0,5%), empregando ácido ascórbico (0,05%), ácido sórbico (0,15%) e ácido salicílico (1%) como estabilizantes. Os cremes foram armazenados a temperatura ambiente (20 °C) e 4 °C. Uma maior estabilidade foi verificada para as amostras contendo 0,3 e 0,5% de fármaco, armazenadas a temperatura de 4 °C. Com exceção do creme a 0,1%, todas as formulações apresentaram um teor de ditranol superior a 85% após 12 meses, a temperatura ambiente.

O ditranol também já foi associado ao naproxeno, um anti-inflamatório usado para o tratamento de dermatites. Essa associação aumentou a liberação do naproxeno e do ditranol, além de reduzir pela metade os principais efeitos adversos, em particular, as manchas na pele (LAU; WHITE; HEARD, 2010).

Prins e colaboradores (1998) realizaram um estudo em 12 pacientes, empregando o fármaco na concentração de 3%, em cremes O/A contendo ácido salicílico. Foi observado que houve irritação por algum mecanismo desconhecido, sem a influência da penetração do fármaco. Os autores acreditam que a base utilizada, que é diferente da convencional (lipofílica) e a alta concentração do fármaco tenha causado esse processo.

O tratamento com ditranol normalmente é realizado em terapias de curto contato, que consiste na sua aplicação uma a duas vezes ao dia, por 10 minutos. O fármaco é utilizado, geralmente, na concentração de 0,01 a 0,5%, em bases semissólidas (vaselina, pasta de Lassar, cremes) (AGARWAL; KATARE; VYAS, 2001). Kirkup e colaboradores (2002) observaram que não houve diferença na evolução do tratamento em função do modo de aplicação, quando se utilizou a pasta de Lassar.

O medicamento é comercializado na forma de cremes e pomadas, nas concentrações de 0,1 a 5,0%, em diversos países (Reino Unido, Suíça, Canadá, Estados Unidos, Portugal, França, Alemanha, Espanha, Turquia, Austrália, Nova Zelândia, Índia). As principais especialidades farmacêuticas compreendem: Anthraforte[®], Anthranol[®], Anthrascalp[®], Antraderm[®], Cignolin[®], Dithrocream[®], Drithocrema[®], Dritho-Scalp[®], Micanol[®], Psoradrate[®] e Psoriderm[®] (Index Merck, 2006). No Brasil, o ditranol pode ser encontrado em preparações magistrais na forma de pomadas. O laboratório Stiefel chegou a produzir o Antranol[®] por certo período, até ser excluído da RENAME.

Estudos já demonstraram que a pele vai se adaptando ao tratamento com ditranol, se tornando menos suscetível aos seus efeitos adversos. Assim, o que se pode fazer é um pré-tratamento das áreas afetadas com concentrações mais baixas, e a partir das respostas da irritação, ir aumentando sua concentração (PARSLEW; FRIEDMANN, 1999). Assim, de acordo com a resposta que cada paciente vai apresentar com a evolução do tratamento, pode-se modificar o tempo de contato (10 até 60min) e a concentração utilizada do fármaco (0,1-0,5% a 1,0-3,0%) (MAHRLE, 1997).

As desvantagens associadas às características físico-químicas do ditranol, como sua alta reatividade que leva à degradação (auto-oxidação), sua solubilidade (insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos) e a baixa permeabilidade (KATARE; AGARWAL; KUMAR, 2008), levaram ao estudo do desenvolvimento de novas formulações, a fim de contornar esses obstáculos farmacotécnicos e terapêuticos.

Um estudo de fotodegradação do ditranol empregando lâmpadas de xenônio foi realizado por Thoma e Holzmann (1998), no qual se investigou a influência de alguns solventes orgânicos na sua estabilidade (metanol, acetona e tetrahidrofurano) com e sem a presença de luz. Os resultados obtidos demonstraram que em metanol o fármaco degrada, aproximadamente, 40% e 24% com e sem a presença de luz, respectivamente, após 30 minutos de contato; uma maior estabilidade foi verificada em tetrahidrofurano (1,7% e 6,7% de degradação na ausência e na presença de luz, respectivamente, após 3 horas); em acetona, o ditranol se mostrou estável na ausência de luz durante o período de análise (3 horas), mas já na presença, uma maior degradação em comparação com os outros solventes foi observada (43,5% em 15 minutos de exposição). Ainda, os pesquisadores avaliaram a estabilidade do fármaco em excipientes utilizados em formulações dermatológicas (polietilenoglicol 400, triglicerídeos de cadeia média – TCM e parafina líquida). Melhores resultados foram obtidos com TCM, uma vez que na ausência de luz não se observou degradação e na presença, 10,1% do fármaco degradou após 3 horas de exposição. A partir destes resultados foi possível

verificar que os produtos de degradação do ditranol são fortemente dependentes do solvente e dos excipientes usados em suas preparações, além da grande interferência da luz.

Em outra abordagem, Gehring e colaboradores (1992) estudaram o efeito do ditranol (0,5%) incorporado em géis de lipossomas com ácido salicílico (3%), os quais possibilitaram um aumento da penetração do fármaco. Seguindo esta mesma linha, Agarwal, Katare e Vyas (2001) desenvolveram sistemas lipossomais e niossomais contendo ditranol, empregando BHT como antioxidante, além de manter as amostras sob atmosfera controlada de nitrogênio por dois meses. O encapsulamento do fármaco nestes sistemas possibilitou o aumento de sua estabilidade e permeabilidade em comparação com formulações tradicionais (creme base). Os lipossomas foram incorporados em géis e as suas propriedades, no sentido de diminuir as manchas provocadas pelas formulações comerciais de ditranol, foram avaliadas. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que estas formulações apresentaram menor incidência de manchas e maior facilidade de lavagem (SARASWAT et al., 2002). Em outro estudo, avaliou-se a irritação destes lipogéis comparando com uma formulação comercial de ditranol em pacientes. O lipogel apresentou maior eficácia, menor irritação e manchas, mostrando ser mais efetivo do que a formulação comercial (SARASWAT et al., 2007).

A permeabilidade do ditranol foi também estudada após sua incorporação em aerogéis de sílica, os quais são normalmente usados para sistemas de liberação oral de fármacos, mas que, neste caso, permitiram uma maior permeabilidade do fármaco no estrato córneo humano em relação à sua tradicional incorporação em vaselina líquida (GUENTHER; SMIRNOVA; NEUBERT, 2008).

O ditranol foi incorporado em lipossomas, entretanto, não se observou aumento do seu efeito para a psoríase, mas ocorreu uma redução da irritação e manchas ao redor das lesões. A desvantagem deste sistema é que ele se apresentou instável para o fármaco (GEHRING, KLEIN, GLOOR, 1994).

A preparação de coevaporados com polivinilpirrolidona foi investigada por Delneville e colaboradores (1998), tendo em vista que esta técnica usa excipientes atóxicos e não irritantes, e o processo é realizado em baixas temperaturas, além de aumentar a solubilidade aquosa e a taxa de dissolução de moléculas lipofílicas. Neste estudo, os autores obtiveram dispersões coloidais aquosas homogêneas, com adequada estabilidade, sob atmosfera controlada de oxigênio.

Um modelo de microemulsão com ditranol foi desenvolvido por Raza e colaboradores (2011). As melhores formulações apresentaram Tween 80[®] e Tween 20[®] como tensoativos, e miristato de isopropila e acetato de tocoferol na fase oleosa. As formulações foram estáveis

por 45 dias e demonstraram um aumento da permeação e da liberação dérmica *ex vivo* do fármaco.

Um modelo de vesículas para a liberação do ditranol foi estudado por Gidwani e Singnurkar (2003) em combinação com ácido salicílico, lipossomas e niossomas. Esse sistema vesicular foi composto de uma nanoemulsão com camadas nanovesiculares. Os tamanhos de partícula obtidos foram de até 450 nm. Os autores relatam que o fármaco não produziu irritação e manchas, e foi muito efetivo no tratamento da psoríase. Foi utilizado o acetato de tocoferol e lecitina de soja, além de BHT e EDTA como antioxidantes.

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas e incorporadas em diferentes formulações (gel-creme e gel) para investigar a sua estabilidade a temperatura ambiente (25°C) e sob ação da luz UVA (CARLOTTI et al., 2009). As concentrações de ditranol utilizadas foram de 0,015%. A velocidade de fotodegradação do ditranol em NLS dispersas no gel e no gel-creme foi menor que o fármaco livre em um sistema de microemulsão. Além disso, uma maior estabilidade a temperatura ambiente foi verificada para as nanopartículas quando estas foram incorporadas em gel-creme (teor de 51% após oito dias de preparação). Ressalta-se que a suspensão aquosa de nanopartículas não foi capaz de estabilizar o fármaco sob tal condição (teor de 55% após um dia de preparação).

Cabe salientar que quando o fármaco é incorporado em base oleosa como a vaselina (formulações mais utilizadas), somente um pequeno percentual deste é liberado da base, ficando retido, em maior proporção, no estrato córneo, sem atingir as camadas mais profundas da epiderme (NEUBERT; WOHLRAB; BENDAS, 1995). Assim, a concentração terapêutica a ser atingida nas mitocôndrias das células das camadas da pele fica comprometida (GUENTHER; SMIRNOVA; NEUBERT, 2008). Além disso, o fármaco apresenta limitada solubilidade nos veículos usualmente empregados, como vaselina e parafina. Desta forma, cuidados durante a manipulação do fármaco e de suas preparações farmacêuticas são necessários.

2.3 Administração cutânea e nanopartículas poliméricas

A pele é composta por camadas distintas (epiderme, derme e hipoderme), sendo uma barreira complexa devido a sua organização anatômica e composição química. O estrato córneo, que é a primeira barreira da epiderme, e a sua estrutura compacta, representa o principal obstáculo para a penetração de substâncias topicamente administradas (FOLDVARI, 2000; KALIA; GUY, 2001).

A liberação na pele das substâncias ativas a partir de formulações depende de alguns fatores. O peso molecular e a lipofilicidade das substâncias, o tipo de formulação, a presença de potencializadores de penetração cutânea, o estado do estrato córneo e o grau de hidratação são aspectos importantes a serem considerados na absorção cutânea de fármacos (VERMA et al., 2003).

As propriedades físico-químicas dos veículos e das substâncias ativas também são responsáveis pela absorção de substâncias na pele (PARDEIKE et al., 2009). Assim, no sentido de aumentar a absorção, parâmetros como o coeficiente de partição, a difusão e a solubilidade, podem ser manipulados. As propriedades físico-químicas do fármaco, sua interação com a membrana e suas propriedades farmacocinéticas também influenciam na absorção (KALIA; GUY, 2001).

Nos últimos anos, diferentes estudos têm sido desenvolvidos no sentido de aumentar a penetração de fármacos ou modificar as características físico-químicas inadequadas de substâncias ativas. Na literatura científica, várias estratégias têm sido relatadas para melhorar a ação de certos fármacos ou contornar suas limitações.

Lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas e nanoemulsões são nanocarreadores amplamente estudados na área farmacêutica e cosmética. Estes sistemas coloidais têm sido alvo de importantes estudos no que tange a questão de aperfeiçoar a liberação de substâncias em um determinado local, atuando como um sistema carreador de fármaco, propiciando sua distribuição em locais específicos (MULLER; MÄDER; GOHLA, 2000; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006).

Os carreadores nanoestruturados permitem direcionar o fármaco no organismo, evitando seu acúmulo em tecidos não específicos, onde poderia apresentar toxicidade, aumentando sua concentração no local de ação e o seu índice terapêutico (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). Adicionalmente, o pequeno tamanho de partícula facilita sua utilização em

produtos dermatológicos e proporciona uma melhora do sensorial na pele (PERUGINI et al., 2002).

Estratégias para aperfeiçoar a liberação de fármacos, como as nanopartículas, tem sido propostas no sentido de melhorar a eficácia de muitos agentes terapêuticos, tanto pela modulação das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas, quanto pela diminuição/eliminação de efeitos colaterais associados a eles, proporcionando maior aceitação pelo paciente (DATE; NAIK; NAGARSENKER, 2006).

As nanopartículas poliméricas são suspensões coloidais que apresentam diâmetro menor do que 1 μm , e podem ser classificadas como nanocápsulas e nanoesfera, dependendo de sua composição e organização (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As nanocápsulas apresentam estrutura vesicular e se diferenciam das nanoesferas (sistemas matriciais) pela presença de um núcleo geralmente oleoso envolto por uma membrana polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). Esses sistemas são vantajosos em relação aos lipossomas, devido à sua maior estabilidade *in vivo* e durante o armazenamento, além da facilidade de incorporação de fármacos lipofílicos (SCHAFFAZICK et al., 2003). Atualmente, em virtude de modificações na composição das nanocápsulas, foram reportadas nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais possuem um núcleo hidrofóbico contendo uma substância lipídica sólida, o monoestearato de sorbitano, apresentando um núcleo mais viscoso do que as nanocápsulas convencionais (JAGER et al., 2009; OURIQUE et al., 2010; VENTURINI et al., 2011).

A composição das nanopartículas pode influenciar na proteção dos fármacos da degradação (WEISS ANGELI et al., 2008), na cinética de liberação do fármaco *in vitro* (MU et al., 2004) e no seu efeito *in vivo* (CRUZ et al., 2006). As formas de associação dos fármacos dependem do tipo de interações destes com o polímero e o óleo, e, no caso das nanocápsulas, não sendo estritamente dependente do coeficiente de partição do fármaco entre a fase oleosa e a aquosa (SCHAFFAZICK et al., 2003). O fármaco pode ser encapsulado na matriz polimérica, no núcleo da nanopartícula, recoberto pela parede polimérica ou quimicamente conjugado ao polímero, ou aderido na superfície da partícula por adsorção, dependendo do tipo de método de preparação (HANS; LOWMAN, 2002). Tamanhos menores de partículas (aproximadamente 100 nm) podem ser obtidos com o uso de polímeros de baixo peso molecular; no entanto, eles podem reduzir a eficiência de encapsulamento de fármacos (BLANCO; ALONSO, 1997; KWON et al., 2001).

A maioria das nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) para aplicação cutânea são preparadas utilizando-se o polímero poli(ϵ -caprolactona), por ser biodegradável,

biocompatível e devido às suas propriedades mecânicas (KIM; RHEE, 2003). Além disso, apresentam um bom potencial para a modificação de superfície via transformações químicas, exibindo um excelente controle farmacocinético, e são adequadas para o aprisionamento e a liberação de uma ampla gama de agentes terapêuticos (FARAJI; WIPF, 2009).

As nanocápsulas poliméricas possuem algumas vantagens quando comparadas às nanoesferas, como o aumento da eficiência de encapsulamento de fármacos lipofílicos devido à presença do núcleo oleoso. A parede polimérica impede que o fármaco entre em contato direto com o tecido, já que ele está potencialmente dissolvido no óleo. Assim, ocorre a redução da irritação, a modulação da liberação do fármaco e a proteção contra a degradação, causada, por exemplo, pelo pH e luz (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008).

Nanocápsulas também podem apresentar uma maior distribuição (ALVES et al., 2007) e eficácia (PAESE et al., 2009) após administração tópica. A grande área superficial, apresentada por estas estruturas, proporciona que as substâncias lipofílicas encapsuladas sejam adequadas para aplicação tópica em formulações cosméticas, promovendo uma liberação homogênea (BOUCHEMAL et al., 2004). O reduzido tamanho de partícula possibilita modificar a atividade de fármacos, delinear e controlar a liberação do ativo, diminuir sua toxicidade, assim como aumentar a adesividade e o tempo de permanência do fármaco na pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Além disso, após administração, tais nanocarreadores podem se acumular no folículo piloso, atingindo estruturas funcionais mais profundas, onde podem ser armazenados por alguns dias e promover um efeito reservatório. Já com as formulações convencionais fica difícil prever o quanto tempo vão permanecer no local de ação, tendo em vista a sua fácil remoção pelo umedecimento, fricção ou qualquer tipo de contato do paciente (LADERMANN et al., 2007).

A associação das nanocápsulas a formulações semissólidas, além das vantagens já citadas, também proporciona uma diminuição do eritema, além de um maior contato do ativo com o estrato córneo, assim como a formação de um filme protetor na superfície da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001). Ainda, promovem maior conforto ao paciente devido à redução do número de administrações (JIMÉNEZ et al., 2004), bem como o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; MARCHIORI et al., 2010).

As nanocápsulas poliméricas apresentam limitada estabilidade físico-química durante o armazenamento e como são sistemas aquosos, podem propiciar o desenvolvimento de micro-organismos. Dessa maneira, a incorporação desses sistemas em formas farmacêuticas

semissólidas, além de aumentar a sua aplicabilidade, pode auxiliar na sua estabilidade (MILÃO et al., 2003; ALVES et al., 2007; MARCHIORI et al., 2010).

Hidrogéis contendo nanocápsulas de tretinoína foram preparados com Carbopol® Ultrez 10 NF e avaliados quanto a sua fotoproteção e permeabilidade em pele humana, através da célula de difusão de Franz. As nanocápsulas associadas ao gel proporcionaram uma maior fotoproteção frente à luz UVA em comparação à suspensão e ao gel contendo o fármaco livre. Além disso, um maior controle da permeabilidade da tretinoína, com maior retenção do fármaco na superfície da pele, comparado com o fármaco não encapsulado, foi observado (OURIQUE et al., 2011).

Milão e colaboradores (2003) prepararam géis hidrofílicos contendo Carbopol® 940 com nanocápsulas de diclofenaco, onde se observou uma estabilidade de três meses de armazenamento. A avaliação da permeabilidade de géis contendo nanopartículas com nimesulida foi avaliada por Alves e colaboradores (2007) utilizando pele humana e células de difusão de Franz. Pode-se observar que os hidrogéis de Carbopol® 940 contendo nanocápsulas de nimesulida apresentaram uma maior concentração de fármaco nas camadas viáveis da pele se comparada aos mesmos hidrogéis de nanoesferas e nanoemulsões.

Nanoemulsões contendo mentol, cânfora e salicilato de metila foram preparadas e incorporadas em géis de Carbopol® 940. Neste estudo, as formulações foram estáveis por até seis meses, sem alteração de tamanho ou separação de fases. O estudo de permeação *in vitro* demonstrou que o gel apresentou uma maior taxa de permeação da cânfora, do mentol e do salicilato de metila, em virtude da atividade termodinâmica e do pequeno tamanho de partícula (MOU et al., 2008).

A coenzima Q-10 é um antioxidante muito utilizado na área cosmética por apresentar uma redução dos sinais da idade na pele. Por ser uma substância muito lábil e levando em conta a capacidade das nanocápsulas de estabilizar certos compostos, Terroso e colaboradores (2009) desenvolveram nanocápsulas contendo a coenzima Q-10 e incorporaram em géis de Carbopol® 940. Os géis apresentaram características adequadas com relação ao tamanho e se observou que a presença das nanocápsulas causou uma alteração no seu comportamento reológico.

Miyazaki e colaboradores (2003) desenvolveram nanocápsulas contendo indometacina e associaram estas a géis. O estudo de liberação demonstrou que as nanocápsulas penetraram intactas através da pele de rato.

Hidrogéis de Carbopol Ultrez®10 NF contendo propionato de clobetasol nanoencapsulado foram desenvolvidos para avaliar sua eficácia no tratamento da dermatite de

contato. As formulações com nanocápsulas e nanoemulsões mostraram um maior controle na liberação comparado aos hidrogéis com o fármaco livre. A influência da presença do polímero foi, também, evidenciada e um maior controle na liberação do fármaco foi verificado para os hidrogéis contendo as nanocápsulas. Esse controle promoveu uma melhor eficácia no tratamento *in vivo* de dermatite de contato e um maior efeito imunossupressivo, demonstrando maior eficácia do fármaco para o tratamento de distúrbios da pele, como a dermatite de contato (FONTANA et al., 2011).

O emprego de nanocápsulas poliméricas para o tratamento da psoríase no sentido de aumentar a atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliado por Marchiori e colaboradores (2010). As suspensões de nanocápsulas de dexametasona apresentaram um aumento da atividade antiproliferativa se comparadas ao fármaco livre, sugerindo uma alternativa para o tratamento desta doença. A incorporação em hidrogéis de Carbopol Ultrez[®] 10 NF foi também realizada e apresentou um maior controle na liberação *in vitro* do fármaco comparado à sua forma livre.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas

- Ácido ascórbico (Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Ácido sórbico (Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Acriloildimetiltaurato/VP (Aristoflex[®] AVC – Clariant, São Paulo, Brasil);
- Butilhidróxitolueno (BHT – Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Carboxipolimetileno (Carbopol[®] 940 – Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Ditranol (Mase, São Paulo, Brasil);
- Imidazolidiniluréia (Germal[®] 115 – Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Metabissulfato de sódio (Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60 – Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Poli(ε-caprolactona) (PCL – Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80 – Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Trietanolamina (Impex, São Paulo, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCM – Delaware Porto Alegre, Brasil).

3.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético modelo HS7 (IKA Werke, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica AL204 (Mettler Toledo Modelo, São Paulo, Brasil);
- Banho de ultrassom Ultracleaner 1400 (Unique, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga para tubos eppendorf 1-14 (Sigma, Alemanha);
- Centrífuga T 32A (Janetzki, Alemanha);

- Analisador de tamanho, potencial zeta e peso molecular de partículas Zetasizer Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Reino Unido);
- Evaporador rotatório modelo 802 (Fisatom, Brasil);
- Potenciômetro digital modelo Seven Easy (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil);
- Sistema de cromatografia líquida Shimadzu LC-20A composto por bomba de alta pressão modelo LC-20AT e detector UV/VIS modelo SPD-M20A PDA (Shimadzu, Japão);
- Viscosímetro rotacional LVDV-II+Pro (Brookfield, Estados Unidos).

3.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetona PA (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau cromatográfico (Tedia, São Paulo, Brasil);
- Ácido acético glacial PA (Tedia, São Paulo, Brasil);
- Água ultrapura MilliQ[®] (Labconco, Estados Unidos);
- Coluna cromatográfica Luna[®] C₁₈ (Phenomenex, Estados Unidos);
- Dispositivo de ultrafiltração Amicon[®] Ultra 0,5 (Millipore, Estados Unidos);
- Membranas de celulose regenerada 0,45 µm de 13 e 47 mm (Millipore, Estados Unidos);
- Pré-coluna (Phenomenex, Estados Unidos).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação das nanoestruturas

Nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009) contendo ditranol foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Para tal, uma fase orgânica composta pelo polímero [poli(ε-caprolactona) – PCL], o óleo (triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico), um tensoativo de baixo EHL (monoestearato

de sorbitano – Span[®] 60) e acetona foi aquecida durante uma hora, a 40 °C. Após resfriamento, adicionou-se o fármaco sob agitação. Após completa homogeneização do sistema, esta fase foi vertida em uma fase aquosa composta por um tensoativo de alto EHL (polissorbato 80 – Tween[®] 80) e água ultrapura. Após 10 minutos de agitação, a formulação foi levada ao evaporador rotatório a 40 °C para evaporação do solvente orgânico e parte da água e ajuste final da concentração do fármaco em 0,5 mg/mL. Finalizada esta etapa, adicionou-se o antioxidante (EDTA – 0,05% ou ácido ascórbico – 0,02%, m/v) em solução. Nanoemulsões foram também preparadas pelo método de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004), contendo os mesmos componentes utilizados na preparação das nanocápsulas, com exceção do polímero. Adicionalmente, formulações contendo ditranol (0,5 mg/mL) e Span[®] 60 dissolvidos em acetona foram preparadas. Esta solução foi vertida em uma solução aquosa contendo Tween[®] 80 e mantida sob agitação magnética durante 10 min. As preparações foram manipuladas e evaporadas sob as mesmas condições experimentais às quais as nanocápsulas e as nanoemulsões foram submetidas, contendo a mesma concentração dos componentes utilizados. Da mesma forma, EDTA ou ácido ascórbico foram adicionados após o ajuste final da concentração do fármaco. Para comparação, nanocápsulas sem os estabilizantes e nanocápsulas brancas (sem a presença do fármaco) foram, também, preparadas e avaliadas.

Todas as formulações foram preparadas em triplicata, ao abrigo da luz e acondicionadas em frascos de vidro âmbar. A composição quali-quantitativa das nanocápsulas e nanoemulsões está descrita na tabela 1.

As formulações foram designadas: nanocápsulas de ditranol contendo EDTA ou ácido ascórbico (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}, respectivamente); nanoemulsões de ditranol contendo EDTA ou ácido ascórbico (DIT-NE_{EDTA} e DIT-NE_{AA}, respectivamente); dispersão do fármaco contendo EDTA ou ácido ascórbico (DIT-D_{EDTA} e DIT-D_{AA}, respectivamente); nanocápsulas brancas contendo EDTA ou ácido ascórbico (NC_{EDTA} e NC_{AA}, respectivamente) e nanoemulsões brancas contendo EDTA ou ácido ascórbico (NE_{EDTA} e NE_{AA}, respectivamente).

Tabela 1 – Composição qualitativa e quantitativa das nanoemulsões e nanocápsulas (n = 3)

Componentes		Quantidade
Fase Orgânica	PCL	0,100 g
	Span [®] 60	0,077 g
	Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico	0,33 g
	Ditranol	0,005 g
	Acetona	27 mL
Fase Aquosa	Tween [®] 80	0,077 g
	Água ultrapura	53 mL
Antioxidantes	EDTA ou	0,005 g
	Ácido ascórbico	0,002 g

*: valores relativos a um volume final de 10 mL;

** : para a preparação das nanoemulsões foi omitida a presença do polímero.

3.2.2 Caracterização físico-química das nanoestruturas

A caracterização físico-química das formulações foi realizada imediatamente após sua preparação e em intervalos de tempo pré-estabelecidos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.1 Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados diretamente nas formulações, empregando um potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

3.2.2.2 Determinação do diâmetro médio e da polidispersão

O diâmetro médio e a polidispersão das partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®]) e por difração a laser (Mastersizer[®]), após diluição das amostras em água ultrapura, na proporção de 1:500 (v/v), previamente filtrada em membrana de 0,45 µm.

3.2.2.3 Determinação do potencial zeta

As análises de potencial zeta foram realizadas por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento empregado para a avaliação do diâmetro médio. Para esta análise, as amostras foram diluídas em solução de NaCl 10 mM (proporção 1:500, v/v), previamente filtrada em membrana de 0,45 µm.

3.2.2.4 Determinação do teor de ditranol nas formulações

O teor de ditranol nas amostras foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com uma bomba modelo LC-20AT, detector SPD-M20A PDA, sistema controlador CBM-20A, coluna C₁₈ Luna[®] (250 mm x 4,60mm, 5 µm) e pré-coluna Phenomenex Security Guard. O método utilizado para análise foi adaptado de Cheach e colaboradores (1989), onde se utilizou uma fase móvel composta de acetonitrila:água (75:25, v/v) com ajuste de pH da água para 3,0 com ácido acético glacial; fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 354 nm.

Para a quantificação do fármaco nas amostras, uma alíquota de 400 µL foi dissolvida em 10 mL de acetonitrila, a fim de obter uma concentração de ditranol de 20 µg/mL. A solução foi sonicada por 5 minutos, com posterior centrifugação (5 minutos – 5000 rpm). Retirou-se uma alíquota do sobrenadante, a qual foi filtrada em membrana de 0,45 µm e injetada no cromatógrafo.

3.2.2.4.1 Validação do método analítico

Para assegurar a utilização deste novo método, ele foi previamente validado seguindo os parâmetros de: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A especificidade foi determinada pela análise das suspensões de nanocápsulas brancas para avaliar se os componentes da formulação poderiam causar alguma interferência ou sobreposição de picos do fármaco neste método. O uso de detector com arranjo de diodos também auxiliou para esta determinação. As amostras foram preparadas e diluídas nas mesmas condições empregadas para as formulações contendo o fármaco.

A curva analítica foi preparada em triplicata, a partir de uma solução de 1000 µg/mL de ditranol em acetonitrila, a fim de obter as concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. A linearidade foi obtida pelo estudo de regressão linear, mediante o método dos mínimos quadrados e analisada por Análise de Variância (ANOVA). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica, de acordo com as equações 1 e 2 (ICH, 2005):

Equação 1.

$$LD = 3,3 \times DP / S$$

Equação 2.

$$LQ = 10 \times DP / S$$

Onde:

S = inclinação da curva de analítica

DP = desvio padrão da resposta

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (precisão intradia) e pela precisão intermediária (entre dias), calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) dos resultados obtidos. Seis amostras independentes foram analisadas na mesma concentração

(20 µg/mL), em triplicata, sob as mesmas condições experimentais, no mesmo dia e durante dois dias.

A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação. Uma solução de ditranol na concentração de 10 µg/mL foi preparada, após extração do fármaco das nanocápsulas com acetonitrila. A esta solução, foram acrescidas quantidades de solução padrão, a fim de obter soluções de concentração de 16, 20 e 24 µg/mL (correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração usual de análise – 20 µg/mL). Todas as soluções foram preparadas e analisadas em triplicata. O percentual de recuperação foi calculado pela diferença entre as áreas obtidas das soluções acrescidas ou não de solução padrão (AOAC, 2000). As nanocápsulas contendo EDTA foram utilizadas na determinação da precisão e exatidão do método.

3.2.2.5 Determinação da eficiência de encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento foi realizada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon Ultra[®], Millipore), a 2200 xG, durante 10 minutos. A eficiência de encapsulamento (taxa de encapsulamento) foi calculada pela diferença entre o conteúdo total de fármaco presente nas nanocápsulas e a concentração encontrada no ultrafiltrado (Equação 3). O ultrafiltrado foi analisado por CLAE.

Equação 3.

$$\text{Taxa} = \frac{C_t - C_l}{C_t} \times 100$$

Onde:

C_t = Concentração total de fármaco

C_l = Concentração de fármaco encontrada no ultrafiltrado

3.2.3 Avaliação do potencial de irritação das nanocápsulas

Para a avaliação do potencial de irritação das nanocápsulas contendo ditranol utilizou-se o método proposto por Lupke (1985). Ovos de galinha da linhagem Cobb 500, provenientes do Laboratório de Avicultura (LAVIC) da UFSM, foram fecundados por 10 dias, mantidos a temperatura (37,3 °C) e umidade (65%) controladas.

Após o período de incubação, os ovos foram retirados da incubadora e colocados em um suporte, com a parte menos convexa do ovo, onde se localiza a câmara de ar, voltada para cima. Em seguida, a casca da parte superior do ovo foi retirada, com auxílio de uma pinça. A primeira membrana que ficou exposta foi umedecida, cuidadosamente, com solução fisiológica estéril e, após alguns segundos de contato, foi removida, expondo-se a membrana corioalantóide.

As amostras foram, então, colocadas em contato com a membrana corioalantóide (0,3 mL). As formulações analisadas neste experimento compreenderam: nanocápsulas de ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}), nanocápsulas brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}) e o fármaco livre, não encapsulado (dispersão em água com auxílio de Span[®] 80 e Tween[®] 80 – DIT-D). A fim de comprovar a eficiência e a qualidade do método, utilizou-se como controles positivos solução de lauril sulfato de sódio a 1% (SLS) e solução de NaOH a 0,1 N, os quais caracterizam reações de vasoconstrição e hemorragia, respectivamente; como controle negativo empregou-se solução fisiológica estéril. Após um tempo de contato de 20 segundos, as amostras foram removidas com auxílio de solução fisiológica. Em seguida, iniciou-se a observação visual de possíveis mudanças que poderiam ocorrer na membrana, por um período de 5 minutos. Os fenômenos verificados foram: hemorragia, vasoconstrição e coagulação. Para cada formulação foram realizadas seis determinações.

O grau de irritação foi determinado de acordo com a equação abaixo:

Equação 4.

$$\text{Índice de HET-CAM} = (301 - h) \times 5 / 300 + (301 - v) \times 7 / 300 + (301 - c) \times 9 / 300$$

Onde:

h = tempo (segundos) no qual se observou a presença de hemorragia;

v = tempo (segundos) no qual se observou a presença de vasoconstrição;

c = tempo (segundos) no qual se observou a presença de coagulação.

OBS: Caso algum dos efeitos não fosse observado era desconsiderado da fórmula.

A partir do valor médio obtido, as amostras foram classificadas em relação ao grau de irritação, de acordo com a classificação descrita na tabela 2.

Tabela 2 – Classificação do potencial de irritação de acordo com o teste de HET-CAM

Índice de HET-CAM	Grau de Irritação
0 a 0,9	Não irritante
1 a 4,9	Ligeiramente irritante
5 a 8,9	Irritante
9 a 21	Muito irritante

3.2.4 Estudos de estabilidade

3.2.4.1 Estabilidade a temperatura ambiente

Para o estudo, as suspensões de nanocápsulas contendo EDTA como estabilizante foram avaliadas nos tempos zero (após preparação), 3, 5, 7 e 15 dias; para as amostras preparadas com ácido ascórbico, o período de avaliação compreendeu zero, 3, 5, 7, 15, 21 e 30 dias. Após cada intervalo de tempo, foram monitorados os seguintes parâmetros: pH, teor, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

3.2.4.2 Fotodegradação

A proteção do fármaco frente à fotodegradação foi realizada pela exposição das nanocápsulas à luz ultravioleta UVA artificial (30 W, modelo POUP AFP 1X32, Intral). Para tal, as amostras (1,0 mL) foram acondicionadas, individualmente, em cubetas plásticas e transparentes que foram mantidas em câmara espelhada a uma distância de 14 cm da luz. Em intervalos de tempos pré-estabelecidos, alíquotas de 0,4 mL foram retiradas e diluídas, a fim de verificar a concentração do fármaco em cada amostra. Para comparação, soluções de ditranol livre (0,5 mg/mL), em uma mistura de acetonitrila:água (40:60, v/v) foram, também, preparadas e avaliadas (DIT-S). Adicionalmente, EDTA (DIT-S_{EDTA}) ou ácido ascórbico (DIT-S_{AA}) foram utilizados, nas mesmas proporções empregadas para as nanocápsulas. O experimento foi realizado em triplicata e após cada intervalo de tempo, a concentração do fármaco nas amostras foi determinada por CLAE, de acordo com a metodologia previamente validada. As análises foram realizadas até se obter 60% de degradação do fármaco.

Para descartar a degradação por fatores que não fosse a presença da luz UVA, cubetas contendo as amostras (nanocápsulas e soluções), envoltas com papel alumínio, foram avaliadas.

Os resultados foram plotados em gráficos de concentração de ditranol *versus* tempo para estabelecer a cinética de degradação do fármaco associado às nanocápsulas. Gráficos de ordem zero, primeira e segunda foram construídos, plotando-se a quantidade remanescente de ditranol *versus* tempo, \ln [quantidade remanescente de ditranol] *versus* tempo e $1/[$ quantidade remanescente de ditranol] *versus* tempo. O coeficiente de correlação para cada gráfico foi calculado e a ordem de reação foi determinada a partir da melhor correlação obtida, calculando-se, também, a constante de degradação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (NUDELMAN, 1975; SINKO, 2006).

3.2.5 Preparação de formulações semissólidas

Formulações semissólidas do tipo hidrogéis foram preparadas, em triplicata, mediante a dispersão do polímero formador de gel nas suspensões de nanocápsulas, com auxílio de gral e pistilo. Dois tipos de polímeros foram empregados: Carbopol[®] 940 e Aristoflex[®] AVC.

Trietanolamina foi utilizada como neutralizante; imidazolidiniluréia, como conservante; metabissulfito de sódio e ácido sórbico, como antioxidantes. Para comparação, hidrogéis contendo o fármaco na forma livre foram, também, preparados mediante a dispersão do ditranol em Tween[®] 80 e posterior incorporação no hidrogel base, em concentração igual ao hidrogel contendo as nanocápsulas. Os hidrogéis foram denominados: hidrogel de Carbopol[®] 940 contendo nanocápsulas de ditranol com EDTA (HGC-DIT-NC_{EDTA}); hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas de ditranol com EDTA e ácido ascórbico (HGA-DIT-NC_{EDTA} e HGA-DIT-NC_{AA}, respectivamente); hidrogel de Carbopol[®] 940 contendo nanocápsulas brancas e EDTA (HGC-NC_{EDTA}); hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas brancas com EDTA e ácido ascórbico (HGA-NC_{EDTA} e HGA-NC_{AA}, respectivamente); hidrogel de Carbopol[®] 940 contendo o fármaco livre com EDTA (HGC-DIT_{EDTA}); hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo o fármaco livre com EDTA e ácido ascórbico (HGA-DIT_{EDTA} e HGA-DIT_{AA}, respectivamente) e hidrogel base de Carbopol[®] 940 (HGC_{EDTA}) e hidrogel base de Aristoflex[®] AVC com EDTA e ácido ascórbico (HGA_{EDTA} e HGA_{AA}, respectivamente). A composição quali-quantitativa das formulações se encontra descrita nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Carbopol[®] 940 contendo nanocápsulas de ditranol e EDTA (HGC-DIT-NC_{EDTA}), nanocápsulas brancas de EDTA (HGC-NC_{EDTA}), ditranol livre (HGC-DIT) e hidrogel base (HGC_{EDTA})

Componente	HGC-DIT-NC_{EDTA}	HGC-NC_{EDTA}	HGC-DIT	HGC_{EDTA}
Carbopol [®] 940	0,125 g	0,125 g	0,125 g	0,125 g
Metabissulfido de sódio	0,025 g	0,025 g	0,025 g	0,025 g
Imidazolidiniluréia	0,125 g	0,125 g	0,125 g	0,125 g
Trietanolamina	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Ditranol	-	-	0,0125 g	-
EDTA	-	-	0,0125 g	0,0125 g
DIT-NC _{EDTA}	q.s.p. 25 g	-	-	-
NC _{EDTA}	-	q.s.p. 25 g	-	-
Tween [®] 80	-	-	0,1925 g	-
Água ultrapura	-	-	q.s.p. 25 g	q.s.p. 25 g

Tabela 4 – Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas de ditranol e EDTA (HGA-DIT-NC_{EDTA}); nanocápsulas brancas de EDTA (HGA-NC_{EDTA}); ditranol livre (HGA-DIT_{EDTA}) e hidrogel base (HGA_{EDTA})

Componentes	HGA-DIT-NC_{EDTA}	HGA-NC_{EDTA}	HGA-DIT_{EDTA}	HGA_{EDTA}
Aristoflex [®] AVC	0,250 g	0,250 g	0,250 g	0,250 g
Ácido sórbico	0,025 g	0,025 g	0,025 g	0,025 g
Ditranol	-	-	0,0125 g	-
EDTA	-	-	0,0125 g	0,0125 g
DIT-NC _{EDTA}	q.s.p. 25 g	-	-	-
NC _{EDTA}	-	q.s.p. 25 g	-	-
Tween [®] 80	-	-	0,1925 g	-
Água ultrapura	-	-	q.s.p. 25 g	q.s.p. 25 g

Tabela 5 – Composição qualitativa e quantitativa dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas de ditranol e ácido ascórbico (HGA-DIT-NC_{AA}); nanocápsulas brancas de ácido ascórbico (HGA-NC_{AA}); ditranol livre (HGA-DIT_{AA}) e hidrogel base (HGA_{AA})

Componentes	HGA-DIT-NC_{AA}	HGA-NC_{AA}	HGA-DIT_{AA}	HGA_{AA}
Aristoflex [®] AVC	0,250 g	0,250 g	0,250 g	0,250 g
Ácido sórbico	0,025 g	0,025 g	0,025 g	0,025 g
Ácido ascórbico	-	-	0,005 g	0,005 g
Ditranol	-	-	0,0125 g	-
DIT-NC _{AA}	q.s.p. 25 g	-	-	-
NC _{AA}	-	q.s.p. 25 g	-	-
Tween [®] 80	-	-	0,1925 g	-
Água ultrapura	-	-	q.s.p. 25 g	q.s.p. 25 g

3.2.6 Caracterização físico-química dos hidrogéis

Os hidrogéis obtidos a partir das nanocápsulas foram caracterizados de acordo com os seguintes testes: pH, teor de fármaco, tamanho de partícula, polidispersão, propriedades reológicas e espalhabilidade. Para os hidrogéis contendo o fármaco livre, os testes empregados compreenderam: pH e teor de fármaco.

3.2.6.1 Determinação do pH

O pH dos hidrogéis foi determinado em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, após dispersão das amostras em água, a uma concentração de 10% (m/m).

3.2.6.2 Determinação do teor de ditranol nos hidrogéis

O teor de fármaco presente nos géis foi determinado por CLAE, de acordo com as condições experimentais descritas no item 3.2.2.4. Para a quantificação, uma alíquota de 1,0 g de gel foi transferida para um balão de 25 mL e a extração do fármaco foi realizada em acetonitrila, sob agitação magnética, por 30 minutos. A amostra foi centrifugada e filtrada em membrana de 0,45 μm e injetada no cromatógrafo. O teor de fármaco foi determinado no tempo zero e após 7, 15 e 30 dias de preparação das formulações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O método analítico foi validado, seguindo os parâmetros de especificidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005). A especificidade do método foi realizada pela análise dos hidrogéis contendo nanocápsulas brancas e pela pureza do pico do fármaco. Na precisão do método, determinou-se o DPR de seis amostras independentes, analisadas sob as mesmas condições experimentais, no mesmo dia (repetibilidade) e em dois dias consecutivos (precisão intermediária). Para a exatidão, utilizou-se o teste de recuperação, a partir da análise de soluções de amostras acrescidas de solução padrão, a fim de obter concentrações de 16, 20 e 24 $\mu\text{g/mL}$ (80, 100 e 120%) da concentração de análise.

3.2.6.3 Determinação do diâmetro médio das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis

O diâmetro médio das nanocápsulas, após incorporação nos hidrogéis, foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®]), após diluição das amostras em água ultrapura, na proporção de 1:500 (m/m), previamente filtrada em membrana de 0,45 μm e homogeneizada em vortex por 5 minutos.

3.2.6.4 Avaliação das propriedades reológicas

A análise das propriedades reológicas e da viscosidade das formulações semissólidas foi realizada utilizando um viscosímetro rotacional (Brookfield, modelo LVDV-II+Pro), com

adaptador para pequenas amostras e sensor de cisalhamento SC4-25. Os ensaios foram conduzidos em triplicata em banho com circulação de água em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e os resultados obtidos foram analisados pelo programa Rheocalc (versão V3.1-1, Brookfield, Estados Unidos).

Os reogramas foram analisados usando diferentes modelos de fluxo: Bingham ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0,5} + \eta^{0,5}\dot{\gamma}^{0,5}$), Ostwald ($\tau = \kappa\dot{\gamma}^n$) e Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + \kappa\dot{\gamma}^n$), onde: τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão de cisalhamento limite, η é a viscosidade, n é o índice de fluxo, κ é o índice de consistência e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003).

3.2.6.5 Avaliação da espalhabilidade

A espalhabilidade das formulações foi avaliada pelo método das placas paralelas, de acordo com a metodologia descrita por Borghetti e Knorst (2006). Uma placa molde, com orifício central de 1,0 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre uma escala milimetrada e uma fonte luminosa. A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com espátula. Após a remoção cuidadosa da placa, a amostra foi pressionada com placas de vidro de pesos conhecidos, em intervalos de 1 minuto entre cada placa, totalizando 10 placas. A área espalhada durante a adição de uma nova placa foi medida, em milímetros, nos eixos vertical e horizontal. Os resultados foram expressos em espalhabilidade em função do peso aplicado, de acordo com a Equação 5. As análises foram realizadas a temperatura ambiente.

Equação 5.

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4$$

Onde:

E_i = área de espalhabilidade (mm^2) após aplicação de determinada massa i (g);

d = diâmetro médio (mm) lido para cada amostra.

Para obter o perfil de espalhabilidade, foram construídos gráficos, plotando-se a área de espalhabilidade (Ei) *versus* peso adicionado. O fator de espalhabilidade (FE) foi, também, calculado, e representa a capacidade de expansão da formulação em uma superfície horizontal quando um grama de peso é adicionado sob a mesma, nas condições experimentais descritas nesta metodologia. A equação 6 foi utilizada para calcular o fator de espalhabilidade (MILAN et al., 2007):

Equação 6.

$$FE = A / P$$

Onde:

FE = é o fator de espalhabilidade (mm².g);

A = espalhabilidade máxima (mm²);

P = peso total adicionado (g).

3.2.7 Análise estatística

As formulações foram preparadas e analisadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o programa SigmaStat, versão 3.0.1.0 (Jandel Scientific, USA). Para o estudo de irritação foi empregado o critério de classificação proposto por este experimento, descrito no item 3.2.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química das nanoemulsões e nanocápsulas contendo ditranol

4.1.1 Determinação do diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulamento

Nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009) contendo ditranol foram preparadas de acordo com metodologia previamente descrita (FESSI et al., 1989). A primeira etapa do trabalho consistiu na escolha dos constituintes da formulação, principalmente no que se refere à estabilização do fármaco e a necessidade de adição de um agente antioxidante. Inicialmente, preparou-se uma formulação de nanocápsula com 0,5 mg/mL de ditranol que, apesar de apresentar boas características relacionadas ao pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão, apresentou baixo teor de fármaco logo após a sua preparação (aproximadamente, 71% de fármaco) (Tabela 6). Além disso, um dia após preparação, observou-se mudança na coloração da formulação, de amarelo claro (coloração inicial) a amarelo escuro e marrom, devido à oxidação do fármaco no meio.

A partir dos resultados iniciais optou-se por adicionar um antioxidante que pudesse retardar o processo da formação de radicais livres que ocorre com o fármaco. De acordo com dados da literatura (AGARWAL; KATARE; VYAS, 2001), o primeiro antioxidante selecionado foi o butilhidroxitolueno (BHT) na concentração de 0,1% (m/v). Além disso, um estudo preliminar já demonstrou que a associação de BHT à nanocápsulas poliméricas foi satisfatória para a estabilização do ácido lipóico (KÜLKAMP et al., 2009). O uso deste antioxidante não mostrou nenhum aumento na estabilidade do ditranol nas nanocápsulas. Posteriormente, optou-se pela utilização de ácido cítrico. Entretanto, as amostras analisadas apresentaram resultados insatisfatórios com relação ao tamanho de partícula (281 ± 05 nm) e polidispersão ($0,29 \pm 0,03$), sendo observada a presença de micropartículas na formulação.

De posse dos resultados obtidos, novas formulações foram preparadas contendo EDTA na sua composição, que por ser um agente quelante e removedor de íons, poderia ajudar na estabilidade do fármaco, reduzindo a atividade catalítica de íons e metais de

transição nas reações de oxidação (GIL e BRANDÃO, 2007), uma vez que o ditranol se oxida facilmente na presença destes. Primeiramente, utilizou-se uma concentração de 0,1% (m/v) de EDTA, adicionado na fase aquosa das nanocápsulas; entretanto, se verificou a presença de partículas com tamanho micrométrico e uma alta polidispersão. Optou-se pelo emprego da metade da concentração utilizada de EDTA e pela adição do mesmo na fase complementar, após o processo de evaporação. Resultados satisfatórios foram alcançados, obtendo-se uma formulação com faixa de tamanho nanométrico (Figura 2), baixo índice de polidispersão e ausência de micropartículas (Figura 3).

Após a escolha de EDTA como antioxidante, houve a tentativa na mudança dos constituintes da formulação a fim de aumentar a estabilidade do fármaco. Nanocápsulas convencionais com óleo mineral e com Span[®] 80 (em substituição aos triglicerídeos de cadeia média e Span[®] 60, respectivamente) foram, também, desenvolvidas. Tais formulações não apresentaram resultados satisfatórios na sua caracterização, apresentando índice de polidispersão acima de 0,3 e grande quantidade de micropartículas.

Muitos trabalhos com formulações de ditranol também apresentam uma grande quantidade de ácidos como estabilizantes, como o ácido sórbico, salicílico e ascórbico (PRINS et al., 1998). Buscando uma formulação mais estável, utilizou-se, também, o ácido ascórbico como estabilizante nas nanocápsulas, que é um agente antioxidante (GIL e BRANDÃO, 2007). Inicialmente, utilizou-se uma concentração de 0,04% (m/v) de ácido ascórbico, adicionado na fase aquosa. A presença de agregados de polímero e o pH muito baixo apresentado pela formulação, fez com que a concentração de ácido ascórbico fosse reduzida para 0,02% (m/v), adicionado no final da preparação das nanocápsulas, conforme descrito para as formulações contendo EDTA. As nanocápsulas preparadas apresentaram resultados satisfatórios na sua caracterização, o que possibilitou, também, o emprego de ácido ascórbico como estabilizante.

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol (0,5 mg/mL), EDTA (DIT-NC_{EDTA}) ou ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}) como estabilizantes, após preparação, apresentaram-se, macroscopicamente, como um líquido homogêneo, leitoso, de coloração amarelo claro, decorrente da presença do fármaco. Para comparação, nanoemulsões (DIT-NE_{EDTA} e DIT-NE_{AA}) e dispersões do fármaco livre (DIT-D_{EDTA} e DIT-D_{AA}) foram, também, preparadas e caracterizadas. Em relação ao aspecto, características semelhantes foram obtidas para as nanoemulsões; as dispersões aquosas apresentaram aspecto semelhante a uma suspensão grosseira, de coloração amarela, com a presença de precipitados de fácil redispersão. Os resultados obtidos na caracterização físico-química das nanocápsulas e nanoemulsões se

encontram na tabela 6. Nas figuras 2 e 3 estão apresentados os resultados da análise de distribuição do tamanho das partículas.

Tabela 6 – Caracterização físico-química das nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo ditranol (0,5 mg/mL) após preparação: DIT-NC_{EDTA}, NC_{EDTA}, DIT-NE_{EDTA} e NE_{EDTA} – nanocápsulas contendo ditranol, nanocápsulas brancas, nanoemulsão contendo ditranol e nanoemulsão branca com EDTA, respectivamente; DIT-NC_{AA}, NC_{AA}, DIT-NE_{AA} e NE_{AA} – nanocápsulas contendo ditranol, nanocápsulas brancas, nanoemulsão contendo ditranol e nanoemulsão branca com ácido ascórbico, respectivamente; DIT-NC – nanocápsulas de ditranol sem antioxidantes (média ± s)

Formulação	pH	Tamanho médio de partícula (nm)	PDI*	Potencial zeta (mV)	Teor (mg/mL)
DIT-NC _{EDTA}	5,56 ± 0,01	241 ± 04	0,16 ± 0,03	-7,6 ± 0,6	0,50 ± 0,02
DIT-NE _{EDTA}	5,49 ± 0,02	223 ± 07	0,22 ± 0,04	-10,1 ± 1,3	0,42 ± 0,03
NC _{EDTA}	5,73 ± 0,07	240 ± 05	0,15 ± 0,03	-12,4 ± 2,2	-
NE _{EDTA}	5,72 ± 0,04	225 ± 12	0,29 ± 0,03	-8,5 ± 1,2	-
DIT-NC _{AA}	4,35 ± 0,06	234 ± 07	0,15 ± 0,01	-9,0 ± 1,4	0,51 ± 0,01
DIT-NE _{AA}	4,31 ± 0,04	257 ± 38	0,30 ± 0,08	-11,7 ± 0,5	0,40 ± 0,01
NC _{AA}	4,35 ± 0,07	230 ± 07	0,15 ± 0,01	-8,6 ± 0,9	-
NE _{AA}	4,28 ± 0,05	249 ± 22	0,31 ± 0,07	-10,1 ± 0,7	-
DIT-NC	6,50 ± 0,05	226 ± 03	0,20 ± 0,07	-10,7 ± 2,9	0,35 ± 0,02

*PDI: índice de polidispersão.

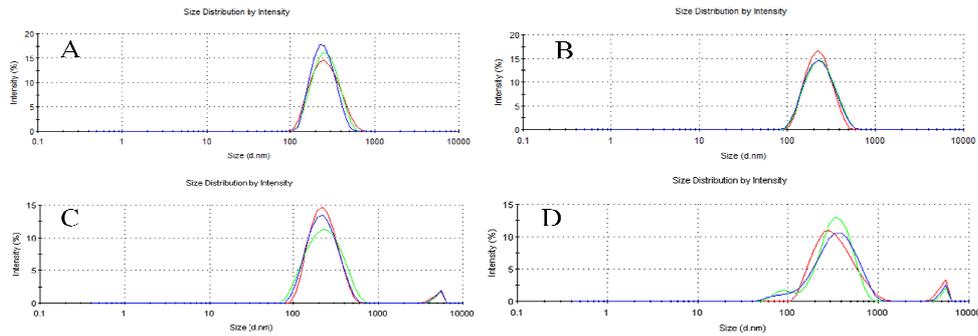


Figura 2 – Distribuição do tamanho de partícula das nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo ditranol (0,5 mg/mL), analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) DIT-NC_{EDTA}, (B) DIT-NC_{AA}, (C) DIT-NE_{EDTA} e (D) DIT-NE_{AA}.

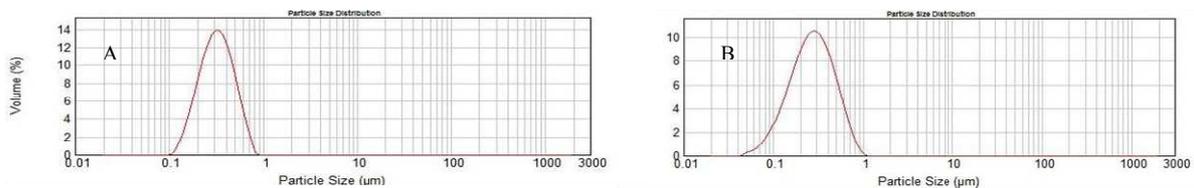


Figura 3 – Distribuição do tamanho de partícula das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol (0,5 mg/mL) analisadas por difração a laser. (A) DIT-NC_{EDTA} e (B) DIT-NC_{AA}.

As nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula na faixa nanométrica (220 a 250 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,25, indicando uma adequada homogeneidade do sistema. Os valores obtidos estão de acordo com os normalmente encontrados na literatura para estes sistemas preparados pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (200-500 nm) (SCHAFFAZICK et al., 2003). Adicionalmente, a análise do tamanho de partícula por difração a laser demonstrou uma distribuição nanométrica, sem a presença simultânea de micropartículas (Figura 3). Diferença significativa não foi observada entre os diâmetros médios das nanocápsulas com ditranol preparadas com EDTA e ácido ascórbico ($p > 0,05$). Em comparação com as nanocápsulas brancas, se verificou que a presença do fármaco não causou diferenças no tamanho de partícula das formulações ($p > 0,05$). A adição de EDTA nas nanocápsulas causou um aumento significativo de tamanho ($p < 0,05$) quando comparada à suspensão não contendo os antioxidantes (DIT-NC); entretanto, diferenças não foram observadas entre as suspensões DIT-NC_{AA} e DIT-NC ($p > 0,05$).

Todas as formulações apresentaram potencial zeta negativo, compreendido entre -7 e -12 mV (Tabela 6). A presença do fármaco alterou significativamente o potencial zeta das nanocápsulas contendo EDTA ($p < 0,05$). Esse comportamento também foi observado para nanocápsulas contendo ácido retinóico. Cabe salientar que a presença do fármaco pode levar a uma menor ou maior exposição dos grupamentos negativos do polímero e dos ácidos graxos livres residuais presentes na fase oleosa das nanocápsulas (LARA, 2008). Entretanto, para a suspensão de nanocápsulas contendo ácido ascórbico, não se observou diferenças entre as nanocápsulas brancas e com ditranol ($p > 0,05$). Por outro lado, comparando as formulações contendo ditranol associado à nanocápsulas (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}), não se observou diferença significativa entre os valores de potencial zeta obtidos ($p > 0,05$). Os baixos valores de potencial zeta, em módulo, são consequência do efeito estérico causado pelo polissorbato 80 que faz um revestimento na parede polimérica das nanocápsulas, e a densidade de carga negativa está relacionada à estrutura química do polímero (PCL) (CATTANI et al., 2010). Cabe salientar que os valores encontrados estão de acordo com os descritos na literatura para nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009; OURIQUE et al., 2010). A adição dos conservantes tanto em DIT-NC_{EDTA}, como em DIT-NC_{AA} não causou alteração no potencial zeta quando comparado com a nanocápsula de ditranol (DIT-NC).

No que se refere ao pH, as nanocápsulas com EDTA apresentaram pH ácido (5,6 a 5,7) devido às características de seus componentes. A presença do fármaco alterou significativamente ($p < 0,05$) o valor de pH das formulações (DIT-NC_{EDTA} e NC_{EDTA}). A presença de EDTA nas nanocápsulas de ditranol não causou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparada às nanocápsulas compostas somente com o fármaco (DIT-NC). Valores de pH mais baixos foram obtidos para as nanocápsulas contendo ácido ascórbico na sua composição (cerca de 4,3) e para estas formulações a presença do fármaco não alterou os valores de pH em comparação com as nanocápsulas brancas ($p > 0,05$).

Para a quantificação do fármaco nas formulações o método analítico foi validado. A escolha das condições cromatográficas foi realizada a partir de dados da literatura (CHEACH et al., 1989) e adaptações que se fizeram necessárias. A especificidade do método foi confirmada pela ausência de picos no cromatograma das soluções obtidas com as nanocápsulas brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}) e pela análise da pureza do pico específico (índice de pureza de pico = 1,000). O método analítico mostrou-se linear na faixa de concentração de 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$ ($y = 49039x - 25662$; $r^2 = 0,9997$). A análise estatística demonstrou regressão significativa ($F_{\text{calculado}} = 13233,74 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e não haver desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 1,11 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$). Os limites de detecção e quantificação foram de 1,09 $\mu\text{g/mL}$ e

3,30 µg/mL, respectivamente. O método foi considerado preciso (DPR de 1,31 e 1,98 para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e exato (% de recuperação = 100,11 ± 1,57) de acordo com as condições analíticas empregadas.

O teor de ditranol nas nanocápsulas, após preparação, foi próximo ao teórico ($0,50 \pm 0,02$ e $0,51 \pm 0,01$ para as formulações DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}, respectivamente), indicando que não houve degradação do fármaco durante o processo de preparação das formulações (Tabela 6). A eficiência de encapsulamento do ditranol nas nanocápsulas foi próxima a 100 %. Cabe salientar que as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) desenvolvidas neste trabalho apresentaram uma maior taxa de associação do que nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas por Carlotti e colaboradores (2009) (eficiência de encapsulamento de 89-92%), além de possuir uma maior quantidade de fármaco.

A fim de verificar diferenças entre os tipos de estrutura, especialmente, a importância da parede polimérica nas nanocápsulas, nanoemulsões contendo ditranol foram, também, preparadas e avaliadas. Da mesma forma, as nanoemulsões (DIT-NE_{EDTA} e DIT-NE_{AA}) apresentaram tamanho nanométrico de partícula (220 a 260 nm), porém diferenças estatísticas foram observadas entre as formulações ($p < 0,05$). Além disso, uma maior polidispersão foi verificada especialmente para as nanoemulsões contendo ácido ascórbico, (DIT-NE_{AA}), indicando uma menor homogeneidade. Em relação ao potencial zeta, um aumento significativo, em módulo ($p < 0,05$), foi verificado para as nanoemulsões em comparação com as respectivas nanocápsulas (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) (Tabela 6).

Uma das principais diferenças observadas se refere ao teor de ditranol. As nanoemulsões DIT-NE_{EDTA} e DIT-NE_{AA}, após preparação, apresentaram um teor de 84 e 80%, respectivamente, indicando uma perda na quantidade inicial de fármaco (Tabela 6). Desta forma, se verifica a importância da presença do polímero em evitar a degradação do fármaco durante o processo de preparação das nanocápsulas, contribuindo com a sua estabilidade. Estudos anteriores já demonstraram que a presença do polímero em sistemas nanoestruturados é importante para a estabilidade de fármacos (CRUZ et al., 2006; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009). Desta forma, as nanoemulsões não foram selecionadas para dar continuidade aos estudos propostos.

Uma das vantagens apresentadas pelas nanocápsulas se refere a possibilidade de proteção de fármacos lábeis e instáveis quimicamente. Em um estudo realizado por Külkamp e colaboradores (2009), as nanocápsulas poliméricas exerceram um efeito protetor sobre o ácido lipóico, aumentando sua estabilidade físico-química em comparação com formulações

contendo o ácido lipóico livre. Estudos recentes demonstraram que a presença do polímero e do óleo nas nanocápsulas aumenta a proteção de fármacos frente à fotodegradação. Fontana e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade do propionato de clobetasol frente à radiação UVA e verificaram que sua associação à nanocápsulas proporcionou uma maior estabilidade quando comparada à nanoesferas e nanoemulsões. Além deste, outros trabalhos tem demonstrado as potencialidades das nanocápsulas em proteger o fármaco frente à fotodegradação (OURIQUE et al., 2008).

Adicionalmente, para avaliar o comportamento do ditranol em meio aquoso, foram preparadas dispersões com EDTA e ácido ascórbico. Os teores de ditranol nas suspensões de nanocápsulas foram superiores aos obtidos para as dispersões do fármaco livre (teores de 48 e 65% para DIT-D_{EDTA} e DIT-D_{AA}, respectivamente). A presença dos componentes das nanocápsulas (polímero e óleo), sem a adição de conservantes, já possibilitou uma maior estabilização do fármaco, que apresentou um teor de 70% logo após o preparo. A partir destes resultados se verifica a importância da nanoencapsulação em proteger o fármaco da degradação durante o processo de preparação das formulações. Apesar da proteção parcial frente à luz realizada durante a preparação, fatores como o ar e água fazem parte do processo de produção.

4.2 Estudos de estabilidade

4.2.1 Estabilidade frente ao armazenamento

Considerando os resultados obtidos, as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol e EDTA ou ácido ascórbico como estabilizantes apresentaram resultados satisfatórios na sua caracterização, as quais foram avaliadas em relação à estabilidade durante o armazenamento, a temperatura ambiente, por um período de 15 (DIT-NC_{EDTA}) e 30 dias (DIT-NC_{AA}). As formulações foram avaliadas em relação ao teor de fármaco, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta e pH. Os resultados obtidos se encontram descritos nas tabelas 7 e 8 e figuras 4, 5 e 6.

No que se refere aos valores de tamanho de partícula (Figura 4) e índice de polidispersão (Figura 5) verifica-se que as formulações mantiveram suas características

iniciais após 15 e 30 dias de armazenamento (formulações DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}, respectivamente), não havendo diferença significativa entre os resultados obtidos ($p > 0,05$). O baixo valor da polidispersão (menor do que 0,2) para todas as formulações indica que as mesmas mantiveram uma adequada homogeneidade.

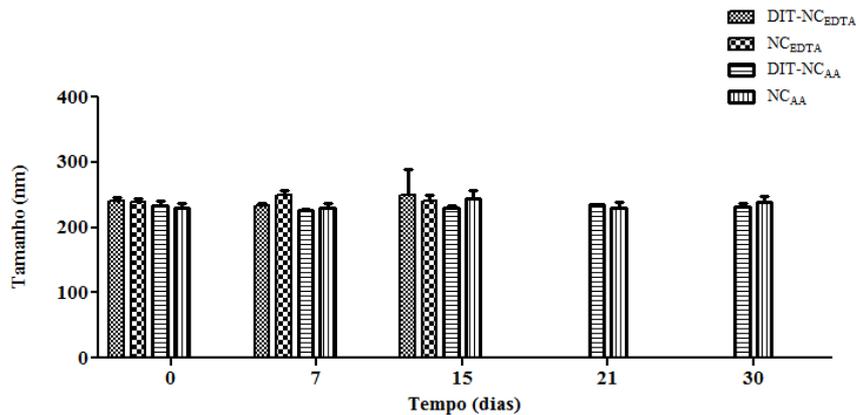


Figura 4 – Tamanho de partícula das nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) e nanocápsulas brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}) durante o estudo de estabilidade.

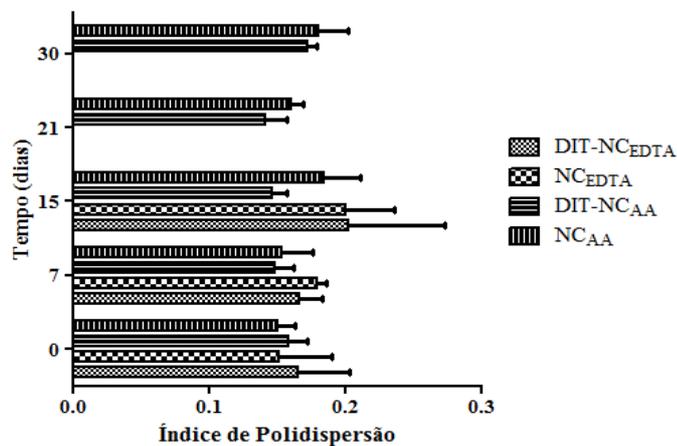


Figura 5 – Índices de polidispersão de nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) e nanocápsulas brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}) durante o estudo de estabilidade.

No que se refere ao potencial zeta (Figura 6), as formulações contendo o fármaco e ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}) não apresentaram diferença significativa em relação ao valor inicial no decorrer do tempo de análise ($p > 0,05$). Comportamento semelhante foi verificado para as nanocápsulas brancas (NC_{AA}). No entanto, um aumento significativo ($p < 0,05$) nos

valores de potencial zeta (em módulo) foi observado para as nanocápsulas contendo EDTA, denotando uma maior estabilidade do sistema. Além disso, diferença significativa entre as nanocápsulas brancas e com o fármaco (DIT-NC_{EDTA} e NC_{EDTA}) foram verificadas em todos os tempos de análise, exceto em 15 dias. Schaffazick e colaboradores (2003) relatam que o potencial zeta é influenciado por alterações na interface com o meio de dispersão, devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula, em função da relaxação da cadeia polimérica.

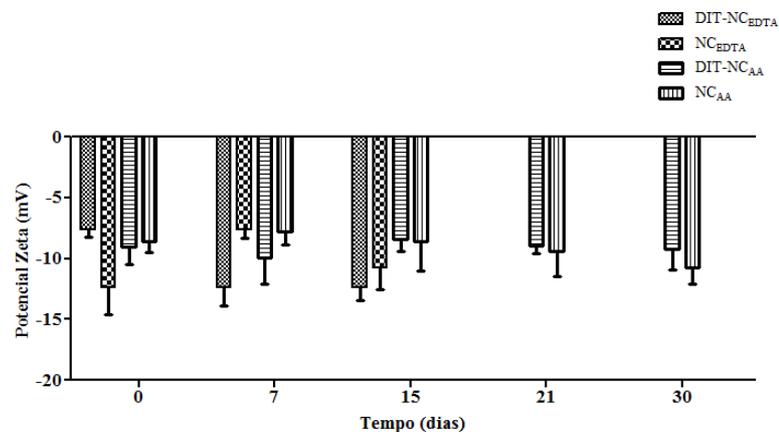


Figura 6 – Potencial zeta das nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) e brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}) durante o estudo de estabilidade.

Em relação ao pH (Tabela 7), verifica-se que as nanocápsulas com ditranol e EDTA mantiveram o pH inicial durante os 15 dias de avaliação, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$). Analisando as mesmas formulações, porém sem o fármaco (NC_{EDTA}), houve diferença em todos os tempos ($p < 0,05$), exceto em sete dias, demonstrando que a presença do fármaco foi importante para manter o pH das suspensões de nanocápsulas. Para as nanocápsulas preparadas com ácido ascórbico se verificou uma queda significativa no pH após três dias de armazenamento ($p < 0,05$), permanecendo estável até o tempo final do período de análise (30 dias) ($p > 0,05$). Esse comportamento foi também observado para as nanocápsulas brancas (NC_{AA}), demonstrando que, neste caso, a presença do fármaco não interferiu na estabilidade das nanocápsulas em relação ao pH. A diminuição do pH pode ser explicada pela provável interação do polímero com a água (JAGER et al., 2007). Além disso, o meio no qual as nanocápsulas estão possui ácido ascórbico na sua composição que pode, também, provocar modificações nesses valores.

Tabela 7 – Estabilidade das nanocápsulas contendo ditranol (0,5 mg/mL) e EDTA: caracterização físico-química após 15 dias de armazenamento a temperatura ambiente e proteção da luz (DIT-NC_{EDTA} – nanocápsulas contendo ditranol e EDTA; NC_{EDTA} – nanocápsulas brancas de EDTA; média ± s)

Tempo (dias)	pH	Teor (mg/mL)
DIT-NC_{EDTA}		
Zero	5,56 ± 0,01	0,50 ± 0,02
3	5,55 ± 0,01	0,51 ± 0,01
7	5,56 ± 0,07	0,38 ± 0,02
15	5,58 ± 0,04	0,26 ± 0,02
NC_{EDTA}		
Zero	5,73 ± 0,07	-
3	5,70 ± 0,08	-
7	5,74 ± 0,08	-
15	5,36 ± 0,08	-

Tabela 8 – Estabilidade das nanocápsulas contendo ditranol (0,5 mg/mL): caracterização físico-química após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente e proteção da luz (DIT-NC_{AA} – nanocápsulas contendo ditranol e ácido ascórbico; NC_{AA} – nanocápsulas brancas e ácido ascórbico; média ± s)

Tempo (dias)	pH	Teor (mg/mL)
DIT-NC_{AA}		
Zero	4,35 ± 0,06	0,51 ± 0,01
3	3,66 ± 0,01	0,51 ± 0,00
7	3,54 ± 0,02	0,50 ± 0,01
15	3,56 ± 0,03	0,48 ± 0,01
21	3,78 ± 0,10	0,43 ± 0,02
30	3,85 ± 0,00	0,35 ± 0,02
NC_{AA}		
Zero	4,35 ± 0,07	-
3	3,71 ± 0,02	-
7	3,66 ± 0,05	-
15	3,66 ± 0,05	-
21	3,80 ± 0,05	-
30	3,98 ± 0,05	-

Um dos principais parâmetros avaliados durante o estudo de estabilidade foi o teor de fármaco nas nanocápsulas, devido a sua baixa estabilidade, especialmente no meio aquoso. As nanocápsulas contendo ditranol e EDTA (DIT-NC_{EDTA}) mantiveram-se estáveis durante três dias de armazenamento a temperatura ambiente (teor de 100%). Uma diminuição do conteúdo do fármaco para 76 e 52% foi verificada no sétimo e décimo quinto dias de análise, respectivamente (Tabela 7). Em comparação com as nanocápsulas contendo ácido ascórbico, uma maior estabilidade foi verificada para estas formulações, as quais apresentaram teor de fármaco acima de 95% até 15 dias de armazenamento. Após 30 dias, uma queda de, aproximadamente, 31% foi verificada (Tabela 8). O ácido ascórbico, além de evitar a possível formação de radicais livres no meio que possam reagir com o ditranol causando a sua degradação, proporcionou valores mais baixos de pH, e ambos auxiliaram para uma maior

estabilização do ditranol no meio, quando comparado às nanocápsulas de ditranol e EDTA (DIT-NC_{EDTA}).

Tendo em vista a alta reatividade do fármaco e, com isso, a possibilidade de sua degradação, decorrente do processo de obtenção das nanocápsulas e pela presença dos constituintes das formulações, outras formulações nanoestruturadas foram, também, preparadas e avaliadas. Nanoesferas contendo ditranol (0,5 mg/mL) e EDTA (0,05%, m/v) foram preparadas pelo método da nanoprecipitação (FESSI et al., 1989), a fim de verificar se a presença do óleo poderia contribuir para a sua instabilidade; para avaliar possíveis interações com o tensoativo lipofílico, preparou-se nanocápsulas sem a presença do monoestearato de sorbitano na fase orgânica. Estas modificações foram realizadas tendo em vista a instabilidade do fármaco na presença de lipídeos descrita na literatura (THOMA; HOLZMANN, 1998). As formulações foram preparadas em triplicata.

As nanoesferas apresentaram características físico-químicas satisfatórias (diâmetro médio de partícula = 163 ± 05 nm; PDI = $0,12 \pm 0,00$; potencial zeta = $-9,1 \pm 1,6$ mV). Após preparação, o teor de ditranol nas nanoesferas foi próximo a 100%; entretanto, após três dias de armazenamento, se verificou uma redução no teor para 75,6%. No que se refere à caracterização, resultados semelhantes foram obtidos para as nanocápsulas preparadas sem a presença de Span[®] 60 (diâmetro médio de partícula = 243 ± 05 nm; PDI = $0,18 \pm 0,01$; potencial zeta = $-7,10 \pm 1,1$ mV). Para estas formulações, o teor de ditranol obtido, após sete dias de armazenamento, foi de 75,1 %, não diferindo da nanocápsula de núcleo lipídico (Tabela 7). A partir destes resultados se verifica que o óleo e o Span[®] 60 não interferem na degradação do ditranol, ao contrário, contribuem para aumentar a sua estabilidade nas suspensões aquosas.

Um dos objetivos de desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco em estudo foi melhorar a sua estabilidade e obter uma formulação aquosa, adequada para uso tópico. A utilização de substâncias antioxidantes se fez necessária e a partir dos resultados obtidos neste trabalho, se verificou que o emprego de EDTA e, especialmente, de ácido ascórbico, possibilitaram estabilizar o fármaco nas suspensões.

O EDTA atua como quelante de metais e desta forma auxilia na estabilização do ditranol, que apresenta uma maior reatividade na presença destes (ASHTON; LOWE; WHITEFIELD, 1983). O ácido ascórbico, por outro lado, por atuar na captura de espécies reativas de oxigênio e ao mesmo tempo por acidificar o pH, auxilia numa maior estabilidade do fármaco quando comparado ao EDTA, já que um dos principais caminhos de degradação

do ditranol é a via oxidativa (ASHTON; LOWE; WHITEFIELD, 1983; MULLER, 1996; CZERSWINSKA et al., 2006).

A literatura reporta a inclusão do ditranol em outros sistemas coloidais, conforme abaixo relatado.

A obtenção de lipossomas contendo ditranol foi realizada por Agarwal e colaboradores (2001). Neste estudo, os lipossomas foram preparados com BHT e mantidos em atmosfera de nitrogênio. Estes sistemas apresentaram uma maior permeação do fármaco comparado aos cremes não-iônicos. Os lipossomas foram posteriormente associado a géis (SARASWAT et al., 2007), onde se observou que houve uma diminuição da irritação e de manchas na pele em pacientes. Em outro estudo, microemulsões contendo ditranol foram desenvolvidas e um teor de 97-100% de fármaco foi obtido durante 45 dias de armazenamento. Essa alta estabilidade do fármaco pode estar relacionada ao uso de tampão acetato pH 3,3 na fase aquosa durante a preparação, além da baixa temperatura de armazenamento (5 °C) (RAZA et al., 2011). Carlotti e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo ditranol na concentração de 0,015%. Um estudo de estabilidade a temperatura ambiente foi realizado e se verificou que após um dia de armazenamento o conteúdo de fármaco foi 55%, diminuindo para 10% após quatro dias. A partir destes resultados, as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas neste trabalho mostraram-se mais estáveis, demonstrando a vantagem destes nanocarreadores em estabilizar o ditranol. Além disso, foi possível empregar uma maior concentração de fármaco.

Apesar da menor estabilidade verificada para a nanocápsula contendo EDTA como estabilizante, optou-se por dar continuidade aos estudos com ambas as formulações (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}), tendo em vista sua posterior inclusão em forma farmacêutica semissólida.

4.2.2 Estudo de fotodegradação

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto, tais como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O ditranol é um fármaco que possui uma grande instabilidade frente à luz, dificultando o seu uso, uma vez que os compostos de degradação causam irritação e manchas na pele (THOMA; HOLZMAN, 1998; CZERWISNKA et al., 2006). O estudo de fotodegradação do ditranol foi realizado no sentido de verificar se a nanoencapsulação poderia proteger o fármaco da radiação, além de acelerar possíveis reações de degradação que possam ocorrer neste processo. As reações de oxidação que ocorrem com o ditranol foram aceleradas pela presença da luz artificial UVA, a qual atuou como um catalisador.

Para o ensaio, as nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) e soluções do fármaco livre em acetonitrila:água (60:40) (DIT-S), contendo EDTA ou ácido ascórbico (DIT-S_{EDTA}; DIT-S_{AA}, respectivamente) foram expostas, por períodos de tempo pré-estabelecidos, a luz UVA, em câmara espelhada. Para determinar a cinética de reação, os ensaios foram conduzidos até um estágio avançado de degradação (cerca de 60%). O teor de ditranol, após cada intervalo de tempo de exposição, foi determinado por CLAE. Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 9 e 10 e nas figuras 7 e 8.

Tabela 9 – Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade do ditranol em nanocápsulas contendo EDTA (DIT-NC_{EDTA}), solução de acetonitrila:água com EDTA (DIT-S_{EDTA}) e solução de acetonitrila:água (DIT-S), obtidos por CLAE (média ± s)

Tempo (h)	Concentração (mg/mL)		
	DIT-NC _{EDTA}	DIT-S _{EDTA}	DIT-S
Zero	0,49 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,50 ± 0,00
0,17	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,43 ± 0,00
0,25	0,50 ± 0,02	0,45 ± 0,00	0,41 ± 0,00
0,5	0,50 ± 0,02	0,38 ± 0,00	0,31 ± 0,00
1	0,43 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,00
1,5	-	0,15 ± 0,00	-
2	0,40 ± 0,01	-	-
3	0,36 ± 0,01	-	-
4	0,28 ± 0,01	-	-
4,5	0,22 ± 0,00	-	-
5	0,18 ± 0,00	-	-

Tabela 10 – Valores experimentais obtidos no estudo de fotoestabilidade do ditranol em nanocápsulas contendo ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}) e solução de acetonitrila:água com ácido ascórbico (DIT-S_{AA}), obtidos por CLAE (média ± s)

Tempo (h)	Concentração (mg/mL)	
	DIT-NC _{AA}	DIT-S _{AA}
Zero	0,51 ± 0,00	0,50 ± 0,00
2	0,44 ± 0,00	0,48 ± 0,00
4	0,37 ± 0,00	0,45 ± 0,00
6	0,36 ± 0,00	0,40 ± 0,01
8	0,34 ± 0,00	0,33 ± 0,00
9	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,00
12	0,29 ± 0,01	-
14	0,27 ± 0,01	-
16	0,27 ± 0,00	-
20	0,20 ± 0,00	-
24	0,17 ± 0,00	-

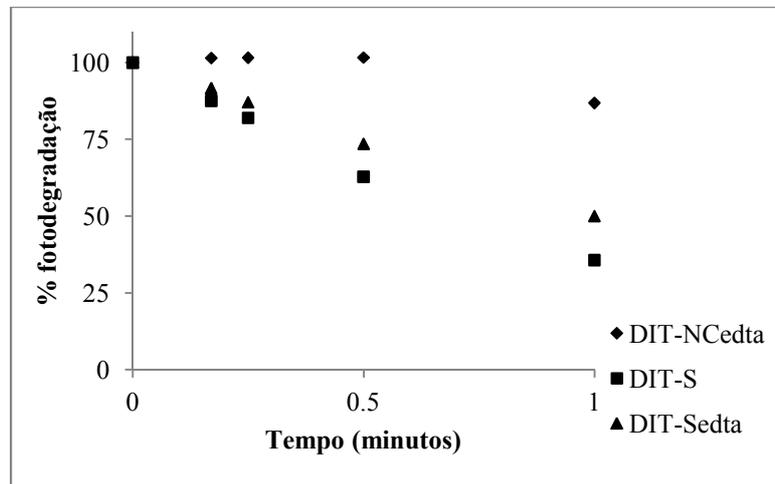


Figura 7 – Percentual de fotodegradação de ditranol livre em solução de acetonitrila:água (DIT-S); solução de acetonitrila:água e EDTA (DIT-S_{EDTA}) e nanocápsulas contendo ditranol e EDTA (DIT-NC_{EDTA}).

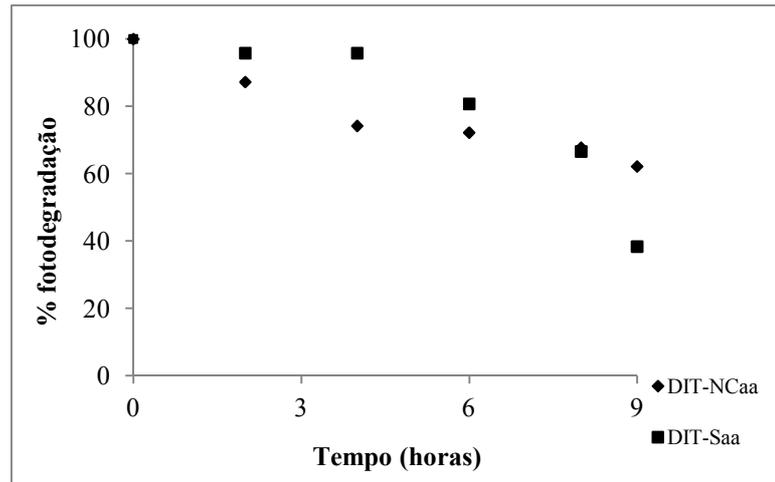


Figura 8 – Percentual de fotodegradação de ditranol livre em solução de acetonitrila:água e ácido ascórbico (DIT-S_{AA}) e nanocápsulas contendo ditranol e ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}).

Como podemos observar, as nanocápsulas foram capazes de proteger o ditranol quando comparadas às soluções do fármaco livre (DIT-S; DIT-S_{EDTA} e DIT-S_{AA}). A nanocápsula contendo ditranol e EDTA (DIT-NC_{EDTA}), após 5 horas de exposição à luz UVA, apresentou um decréscimo no teor de fármaco de, aproximadamente, 60% em comparação com as soluções do fármaco livre, as quais apresentaram cerca de 65 e 70% de degradação após 1 hora (DIT-S) e 1 hora e 30 minutos (DIT-S_{EDTA}), respectivamente (Tabela 9). A presença do EDTA na solução contribuiu para a estabilidade do ditranol. Em comparação com as nanocápsulas contendo ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}), se verificou que a presença do mesmo proporcionou uma maior estabilidade, uma vez que após 20 horas de exposição se verificou um decréscimo no teor de fármaco de, aproximadamente, 60%; resultado semelhante foi obtido para a solução do fármaco livre (DIT-S_{AA}) após 9 horas de exposição (Tabela 10).

Comparando-se os perfis de fotodegradação das amostras contendo EDTA e ácido ascórbico se verificou que o ácido ascórbico proporcionou uma maior estabilidade do ditranol nanoencapsulado e livre (em solução). Além disso, diferenças no comportamento do fármaco foram observadas. Nas formulações preparadas com EDTA se observou uma degradação gradual do fármaco, e uma maior estabilidade do mesmo nas nanocápsulas em todos os tempos de análise (Figura 7). Para as amostras contendo ácido ascórbico, inicialmente se verificou uma maior estabilidade do ditranol em solução até 6 horas de exposição; valores semelhantes foram obtidos em 8 horas de exposição para as nanocápsulas e a solução do fármaco livre; entretanto, após este período, se verificou um decaimento acentuado na

concentração do ditranol livre (de 0,33 mg/mL para 0,19 mg/mL). Para as nanocápsulas, após 9 horas de exposição, a concentração de ditranol foi de 0,31 mg/mL (Tabela 10). Conforme os dados observados, as nanocápsulas apresentaram uma proteção mais prolongada e constante se comparada com o fármaco livre.

Através dos resultados, se verifica a importância da encapsulação de fármacos em aumentar a sua estabilidade, especialmente, neste caso, pois se refere a uma substância altamente instável e suscetível a degradação, principalmente, em meio aquoso. As nanocápsulas, pela presença da parede polimérica, e a adição dos antioxidantes, proporcionaram uma maior estabilidade do ditranol nas condições experimentais avaliadas. Estes resultados corroboram com os estudos descritos na literatura, nos quais se verificou a fotoproteção proporcionada pelas nanocápsulas poliméricas preparadas com PCL, na encapsulação da tretinoína (OURIQUE et al., 2008); do clobetasol (FONTANA et al., 2009); da benzofenona (PAESE et al., 2009); octilmetoxicinamato (WEISS-ANGELI et al., 2008) e resveratrol (DETONI et al., 2012). Este maior efeito protetor pode estar relacionado à sua característica semicristalina e a capacidade em refletir e espalhar a radiação UV (PERUGINI et al., 2002; JIMÉNEZ et al., 2004).

Tendo em vista que as reações fotoquímicas podem ser acompanhadas por reações térmicas, uma solução controle foi avaliada no tempo total de análise, a qual manteve a concentração inicial do fármaco (teor acima de 95%). Desta forma, conclui-se que a degradação observada foi somente devido à presença da luz UVA e não por um possível aquecimento que pode ser promovido pela radiação.

Neste trabalho, a cinética de degradação do ditranol nanoencapsulado e livre foi determinada, a partir dos resultados experimentais obtidos. Para tal, foram plotados gráficos de concentração *versus* tempo (ordem zero), logaritmo da concentração *versus* tempo (primeira ordem) e $1/\text{concentração}$ *versus* tempo (segunda ordem). A ordem de reação foi determinada pelo melhor coeficiente de correlação. A avaliação dos resultados demonstrou que as soluções do fármaco livre (DIT-S; DIT-S_{EDTA} e DIT-S_{AA}) e a nanocápsula com EDTA (DIT-NC_{EDTA}) apresentaram reação de ordem zero, ou seja, a concentração de ditranol presente nestas amostras diminuiu proporcionalmente em função do tempo de exposição. Uma cinética de reação de primeira ordem foi verificada para a nanocápsula com ácido ascórbico (DIT-NC_{AA}). Após estabelecer a ordem de reação, a constante de degradação (k) e o $t_{1/2}$ (tempo necessário para que ocorra 50% de degradação) foram calculados (SINKO, 2006). Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Parâmetros de velocidades de reação (k), tempo de meia-vida e correlação para ditranol em solução acetonitrila:água (DIT-S e DIT-S_{EDTA}) e nanocápsulas (DIT-NC_{EDTA}) após fotodegradação

Amostras	k (horas⁻¹)	t_{1/2} (horas)*	r
DIT-S	0,3192 ± 0,0057	0,78 ± 0,01	0,9955 ± 0,0012
DIT-S _{EDTA}	0,2494 ± 0,0019	1,04 ± 0,01	0,9974 ± 0,0017
DIT-NC _{EDTA}	0,0626 ± 0,0050	3,97 ± 0,33	0,9854 ± 0,0037

*: valores calculados considerando uma cinética de ordem zero.

Tabela 12 – Parâmetros de velocidades de reação (k), tempo de meia-vida e correlação para ditranol em solução acetonitrila:água (DIT-S_{AA}) e nanocápsulas (DIT-NC_{AA}) após fotodegradação

Amostras	k (horas⁻¹)	t_{1/2} (horas)	r
DIT-S _{AA}	0,0332 ± 0,0000*	7,54 ± 0,01*	0,9422 ± 0,0075
DIT-NC _{AA}	0,0415 ± 0,0010**	16,68 ± 0,41**	0,9852 ± 0,0018

*: valores calculados considerando uma cinética de ordem zero.

** : valores calculados considerando uma cinética de primeira ordem.

As reações de degradação de fármacos ocorrem a velocidades definidas, são de natureza química e dependem de condições como temperatura, concentração dos reagentes, pH, radiação e presença de catalisadores. De acordo com a cinética de reação, são classificadas em reações de ordem zero, primeira e segunda ordem (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; AULTON, 2005). Em uma reação de ordem zero, a velocidade de reação (decomposição) é independente da concentração da substância ativa. Neste tipo de reação o fator limitante é outro que não a concentração dos reagentes, como, por exemplo, a solubilidade ou a absorção da luz. Nas reações de primeira ordem uma substância decompõe-se em um ou mais produtos, e a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do reagente (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O fato das amostras apresentarem diferentes cinéticas de reação pode estar relacionado a alguns fatores, como constituintes presentes nas formulações, pH, entre outros, os quais

podem acelerar ou diminuir a velocidade de reação. Dentre eles, o pH, a força iônica e a constante dielétrica exercem papel importante (NUDELMAN, 1975). A presença de EDTA ou ácido ascórbico nas soluções de ditranol não alterou a cinética de reação, somente a extensão da velocidade de degradação do fármaco; entretanto, a presença de ácido ascórbico influenciou na cinética de reação do ditranol na nanocápsula.

A decomposição por oxidação e redução de fármacos é responsável pela instabilidade de um número considerável de preparações farmacêuticas. Devido à complexidade e sensibilidade dos processos oxidativos para detectar metais ou outras impurezas, é difícil reproduzir e estabelecer mecanismos para as reações. A auto-oxidação é a forma mais comum de decomposição oxidativa que ocorre nas preparações farmacêuticas, e envolve a formação de radicais livres num processo em cadeia (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). No caso específico do ditranol, as reações de degradação envolvem, principalmente, o processo de auto-oxidação (CZERWINSKA et al., 2006).

O início desta reação pode ocorrer por decomposição térmica das substâncias ou, possivelmente, pela presença de luz. Para tal, uma pequena quantidade de oxigênio é necessária para dar início à reação e, conseqüentemente, a concentração de oxigênio no meio é pouco importante. Na maioria dos casos, a degradação oxidativa de fármacos segue cinéticas de primeira ou de segunda ordem de reação (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Cabe salientar que durante o estudo de fotoestabilidade do ditranol os cromatogramas obtidos foram monitorados, observando-se o surgimento de picos adicionais e a pureza do pico do fármaco. A partir dos resultados, foram verificados picos adicionais nos cromatogramas das amostras irradiadas pela luz UVA (Apêndice B), relacionados aos compostos de degradação do ditranol. O pico do fármaco permaneceu com índice de pureza igual a 1,000 para todos os tempos e amostras analisadas, demonstrando a especificidade do método na quantificação do ditranol nas amostras degradadas, de acordo com as condições experimentais utilizadas.

Após a realização deste ensaio, conclui-se que a presença dos constituintes das nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho auxiliaram na proteção do ditranol frente à fotodegradação, induzida pela radiação UVA.

4.3 Avaliação do potencial de irritação das nanocápsulas

O ensaio de irritação ocular é um dos métodos mais antigos para assegurar a irritação química de substâncias (EUN; SUH, 2000). Draize (1944) desenvolveu um sistema de classificação para avaliar o potencial de irritação de fármacos e outros materiais, aplicados topicamente na pele e nos olhos de coelhos albinos. Este ensaio tem sido bastante criticado devido às injúrias e a baixa correlação dos resultados se comparado aos humanos (SPIELMAN, 1997).

Com alternativa ao método de Draize, Lupke (1985) desenvolveu um método capaz de reduzir o número de animais, assim como limitar ou eliminar dor e injúrias durante os experimentos. Assim, incluiu-se o teste da membrana corioalantóide (HET-CAM) como um teste de irritação de mucosas, o qual apresenta alta sensibilidade, possibilitando diferenciar substâncias irritantes de não irritantes (SPIELMAN, 1997). A membrana corioalantóide possui uma ampla irrigação sanguínea, não tem inervação sensorial e isso implica na ausência de dor no embrião quando produtos irritantes são testados. Suas características físicas a tornam um modelo promissor para respostas. Além disso, é altamente vascularizada como a conjuntiva e tem se mostrado capaz de responder à irritação severa (LEIGHTON; NASSAUER; TCHAO, 1985). Entretanto, algumas substâncias que se aderem à membrana e não podem ser removidas com a solução de lavagem, ou que manchem a membrana, não podem ser avaliadas por este método, além da impossibilidade de diferenciar efeito corrosivo de irritação severa, que pode ser observado no ensaio em coelhos (MARTINS, PAULUHN MACHEMER, 1992).

A avaliação do efeito irritante do ditranol foi realizada pelo método do HET-CAM. Para tal, as nanocápsulas contendo ditranol (DIT-NC_{EDTA} e DIT-NC_{AA}) foram comparadas com o fármaco livre e aos controles positivos (solução de NaOH 0,1 N e lauril sulfato de sódio 1%). A fim de verificar se as matérias-primas destas formulações poderiam causar algum efeito irritante, foram avaliadas as nanocápsulas brancas (NC_{EDTA} e NC_{AA}). As amostras foram aplicadas em seis ovos e após a observação das reações produzidas, o grau de irritação foi calculado.

Os controles positivos foram classificados como severamente irritantes ($10,80 \pm 0,22$ para a solução de SLS 1% e $17,43 \pm 1,22$ para a solução de NaOH 0,1 N), resultados esperados para estas soluções (VINARDELL; MACIÁN, 1994). Para o controle negativo (solução salina), reações de irritação não foram observadas (não irritante).

As nanocápsulas brancas não apresentaram efeito após a sua aplicação sobre a membrana, durante os 5 minutos de análise. Isso comprova que as matérias-primas utilizadas na preparação das formulações não causam irritação, garantindo a segurança de sua utilização. Resultados semelhantes foram obtidos para as nanocápsulas contendo ditranol, nas quais não se observou efeito irritante. Entretanto, a dispersão com ditranol foi classificada como muito irritante ($10,43 \pm 0,67$), uma vez que hemorragia e vasoconstrição foram verificadas após sua aplicação na membrana corioalantóide. Este resultado demonstra que a inclusão do ditranol em nanocápsulas foi de fundamental importância no sentido de diminuir o efeito irritante do mesmo, em relação ao potencial de causar vasoconstrição e hemorragia. Além disso, o pH das formulações não influenciou nos resultados observados, uma vez que a nanocápsula contendo ácido ascórbico (pH de 4,35) não demonstrou algum tipo de irritação. As nanocápsulas contendo EDTA possuem um pH em torno de 5,55, que é favorável para a não-irritação de mucosas (VINARDELL; MACIÁN, 1994). Por outro lado, a dispersão do fármaco (pH de 5,05) mostrou-se extremamente irritante, devido a presença do ditranol livre (não encapsulado).

A avaliação do potencial de irritação pelo método de HET-CAM de nanocápsulas poliméricas com PCL é insipiente na literatura. Gupta e colaboradores (2011) realizaram um ensaio para avaliar a irritação de nanopartículas poliméricas com PLGA e levofloxacinol, onde também não foi encontrado efeito irritante. Nanocápsulas de coenzima Q10 também foram analisadas e não apresentaram efeito irritante por este método (FELIPPI et al., 2012). Nanoesferas de PLGA e flubipofeno já foram analisadas por este método e também se mostraram inócuas para o uso ocular (ARAÚJO et al., 2009).

Os ensaios *in vitro* oferecem várias vantagens, como rapidez, reprodutibilidade das condições, aumento da sensibilidade e redução do número de animais usados, além de selecionar um grande número de compostos que possivelmente necessitem de avaliações mais específicas (WILSON; STECK, 2000; EUN; SUH, 2000).

O ensaio HET-CAM não deve e não pode substituir totalmente os testes toxicológicos em animais. Entretanto, pode atuar como um teste de seleção e reduzir o número de animais usados; limitar ou eliminar dor e injúrias durante os experimentos com animais. Além disso, este ensaio apresenta uma boa correlação com o ensaio de Draize em coelhos (LUPKE, 1985).

Cabe salientar que os resultados obtidos neste trabalho são preliminares e estudos adicionais são necessários para comprovar o efeito não irritante verificado para as nanocápsulas de ditranol.

4.4 Caracterização físico-química dos hidrogéis

4.4.1. Determinação do pH, teor, tamanho de partícula e polidispersão

A preparação de formulações semissólidas contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação cutânea tem sido estudada recentemente, visando a liberação e a permeação controlada de algumas substâncias ativas (OURIQUE et al., 2011), além de aumentar o tempo de retenção na superfície da pele (ALVES et al., 2007), proporcionar um maior efeito do fármaco (FONTANA et al., 2011; LENZ et al., 2012) e aumentar sua estabilidade (MILÃO et al., 2003; PAESE et al., 2009). A incorporação de sistemas nanoestruturados em hidrogéis pode ainda, diminuir os efeitos do contato direto do fármaco sobre a pele (PAESE et al., 2009).

Agentes de viscosidade como Pluronic[®] F127 [poli-(oxietileno)-b-poli-oxipropileno)] (MIYAZAKI et al., 2003), Satiaxano[®] CX91 (goma xantana purificada) (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001), Natrosol[®] 250 M (hidroxietilcelulose) (LUENGO et al., 2006), Carbopol Ultrez[®] 10 NF (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2011) e Carbopol[®] 940 (ALVES; POLHMANN; GUTERRES, 2005; MILÃO et al., 2003) já foram utilizados na preparação de formulações semissólidas contendo nanopartículas poliméricas. Entretanto, até o presente momento, não há relatos na literatura da utilização de Aristoflex[®] AVC na preparação de hidrogéis contendo nanocápsulas.

O Carbopol[®] 940 (carboxipolimetileno) é um polímero muito utilizado na indústria cosmética e farmacêutica devido a sua facilidade de manipulação, que quando neutralizado aumenta o seu poder espessante (GIL; BRANDÃO, 2007). O Aristoflex[®] AVC (acriloldimetiltaurato/VP) é um polímero sintético pré-neutralizado que permite a formação de géis cristalinos, consistentes e estáveis em meios ácidos (PHARMA SPECIAL, 2012).

Desta forma, neste trabalho, hidrogéis de Carbopol[®] 940 foram preparados empregando as nanocápsulas de ditranol e nanocápsulas brancas contendo EDTA (HGC-DIT-NC_{EDTA} e HGC-NC_{EDTA}, respectivamente) e hidrogéis de Aristoflex[®] AVC, utilizando as formulações contendo EDTA (HGC-DIT-NC_{EDTA} e HGA-NC_{EDTA}) e ácido ascórbico (HGA-DIT-NC_{AA} e HGA-NC_{AA}). A utilização de Aristoflex[®] AVC foi realizada tendo em vista o caráter inovador dos hidrogéis propostos e o baixo pH apresentado pelas amostras contendo

ácido ascórbico na sua composição. Para comparação, hidrogéis contendo o fármaco livre (HGC-DIT_{EDTA}, HGA-DIT_{EDTA} e HGA-DIT_{AA}) foram, também, preparados.

No que se refere à análise macroscópica, os hidrogéis contendo as nanoestruturas apresentaram aspecto homogêneo, brilhoso, coloração amarelo claro (hidrogéis contendo ditranol associado à nanocápsulas) e branca (hidrogéis contendo as nanocápsulas brancas). Os hidrogéis contendo o fármaco livre apresentaram-se homogêneos, transparentes e coloração amarela; características semelhantes foram observadas para os hidrogéis base (sem as nanoestruturas e o fármaco), diferindo-se na cor, os quais se apresentaram incolores.

Para a quantificação do fármaco nos hidrogéis, o método analítico foi validado. A especificidade do método foi confirmada pela ausência de picos no cromatograma das soluções obtidas com os géis com as nanocápsulas brancas (HGC-NC_{EDTA}, HGA-NC_{EDTA} e HGA-NC_{AA}), e pela análise da pureza do pico do ditranol (índice de pureza de pico = 1,000). O método foi considerado preciso (DPR de 1,70 e 1,53 para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e exato (% de recuperação = $100,58 \pm 1,25$) de acordo com as condições analíticas empregadas.

Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis se encontram na tabela 13.

Tabela 13 – Valores de pH e teor obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de ditranol (HGC-DIT-NC_{EDTA}, HGA-DIT-NC_{EDTA} e HGA-DIT-NC_{AA}); nanocápsulas brancas (HGC-NC_{EDTA}, HGA-NC_{EDTA} e HGA-NC_{AA}); fármaco livre (HGC-DIT_{EDTA}, HGA-DIT_{EDTA} e HGA-DIT_{AA}) e hidrogéis base (HGC_{EDTA}, HGA_{EDTA} e HGA_{AA}) (média ± s)

Formulação	pH	Teor (mg/g)
HGC-NC _{EDTA}	5,67 ± 0,02	-
HGC-DIT-NC _{EDTA}	5,63 ± 0,04	0,51 ± 0,01
HGC-DIT _{EDTA}	5,62 ± 0,02	0,49 ± 0,01
HGC _{EDTA}	5,71 ± 0,10	-
HGA-NC _{EDTA}	4,22 ± 0,03	-
HGA-NC _{AA}	4,07 ± 0,02	-
HGA-DIT-NC _{EDTA}	4,25 ± 0,05	0,51 ± 0,00
HGA-DIT-NC _{AA}	4,10 ± 0,03	0,51 ± 0,02
HGA-DIT _{EDTA}	4,13 ± 0,00	0,50 ± 0,02
HGA-DIT _{AA}	4,24 ± 0,00	0,49 ± 0,00
HGA _{EDTA}	3,97 ± 0,05	-
HGA _{AA}	4,25 ± 0,00	-

Os hidrogéis de Carbopol[®] 940 apresentaram pH ácido, em torno de 5,6 a 5,7. A adição das nanocápsulas não alterou de forma significativa o pH destas formulações ($p > 0,05$). As formulações com Aristoflex[®] AVC apresentaram valores de pH mais baixos quando comparadas às preparações com Carbopol[®] 940 (4,0 a 4,2) (Tabela 13), tendo em vista a presença dos ácidos ascórbico e sórbico. Da mesma forma, diferença significativa não foi verificada entre as formulações ($p > 0,05$).

É importante destacar que os valores de pH obtidos são compatíveis com a aplicação tópica, cuja epiderme apresenta valores de pH de 4,0 a 6,5, dependendo da região (BLOCK, 2004). Valores de pH incompatíveis ao pH da pele podem levar à perda da integridade cutânea, deixando-a mais suscetível à agressão por agentes externos (SCHREML et al., 2010).

O teor de ditranol nos hidrogéis, após preparação, foi próximo ao teórico (aproximadamente, 0,5 mg/g) para todas as formulações avaliadas (Tabela 13), indicando que

não houve degradação do fármaco durante o processo de manipulação das formulações e associação com os polímeros dos hidrogéis.

No sentido de avaliar a presença das nanopartículas após a preparação dos hidrogéis, os mesmos foram dispersos em água ultrapura (1:500, m/m) e a dispersão aquosa foi analisada por espectroscopia de correlação de fótons. As formulações apresentaram diâmetro médio de partícula na faixa nanométrica (230 a 270 nm) e índice de polidispersão abaixo de 0,30 (Tabela 14). Os valores encontrados foram semelhantes aos obtidos para as suspensões de nanocápsulas (Tabela 6). Além disso, no que se refere ao tamanho, diferenças significativas não foram observadas entre os hidrogéis ($p > 0,05$). Estes resultados sugerem que, após a preparação dos géis, mudanças significativas no tamanho das nanocápsulas não ocorreram. Alguns estudos já verificaram que a utilização do Carbopol[®] 940 em géis manteve o tamanho de partícula das nanocápsulas (TERROSO et al., 2009) e nanoemulsões (MOU et al., 2008).

Tabela 14 – Determinação do diâmetro médio e da polidispersão dos hidrogéis contendo nanocápsulas de ditranol (HGC-DIT-NC_{EDTA}, HGA-DIT-NC_{EDTA} e HGA-DIT-NC_{AA}) e nanocápsulas brancas (HGC-NC_{EDTA}, HGA-NC_{EDTA} e HGA-NC_{AA}) (média \pm s)

Formulação	Tamanho	PDI*
HGC-NC _{EDTA}	252 \pm 13	0,24 \pm 0,02
HGC-DIT-NC _{EDTA}	240 \pm 23	0,21 \pm 0,02
HGA-NC _{EDTA}	243 \pm 05	0,23 \pm 0,03
HGA-NC _{AA}	238 \pm 05	0,19 \pm 0,01
HGA-DIT-NC _{EDTA}	237 \pm 04	0,17 \pm 0,02
HGA-DIT-NC _{AA}	267 \pm 27	0,26 \pm 0,07

*PDI: índice de polidispersão.

4.4.2 Avaliação reológica e da espalhabilidade dos hidrogéis contendo as nanocápsulas de ditranol

A avaliação das propriedades reológicas de formas farmacêuticas semissólidas tem uma importância fundamental, uma vez que serve de suporte para predizer o comportamento da formulação e também auxilia nas ações de processamento do produto, além de poder avaliar sua qualidade e estabilidade. As propriedades reológicas das formulações estão diretamente relacionadas ao enchimento e remoção do produto no envase, à sua espalhabilidade e aderência à pele, ao uso pelo paciente e à estabilidade do produto (SINKO, 2006).

Os reogramas dos hidrogéis contendo as nanocápsulas e os hidrogéis base foram obtidos através da representação gráfica da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento (Figuras 9 e 10), e tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento (Figuras 11 e 12). A partir dos resultados se verificou que todas as formulações apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano, uma vez que não se observou uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicada, característico de sistemas semissólidos (KIM et al, 2003). Todas as análises foram realizadas com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em banho de água com circulação.

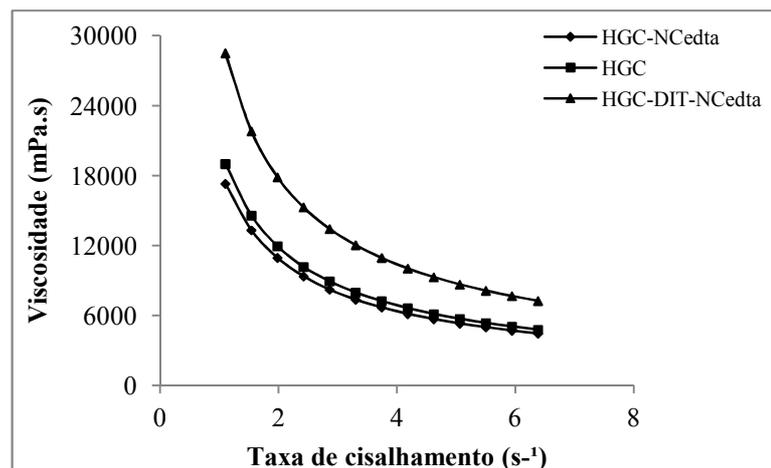


Figura 9 – Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Carbopol[®] 940 em relação a taxa de cisalhamento (s⁻¹).

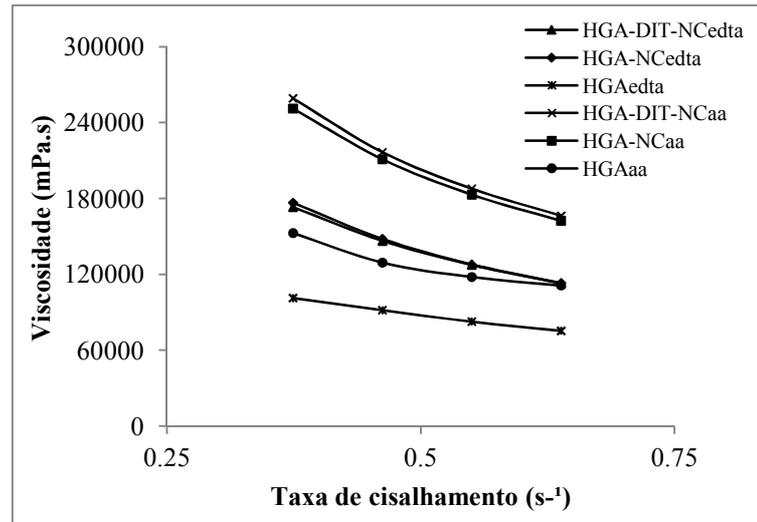


Figura 10 – Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC em relação a taxa de cisalhamento (s⁻¹).

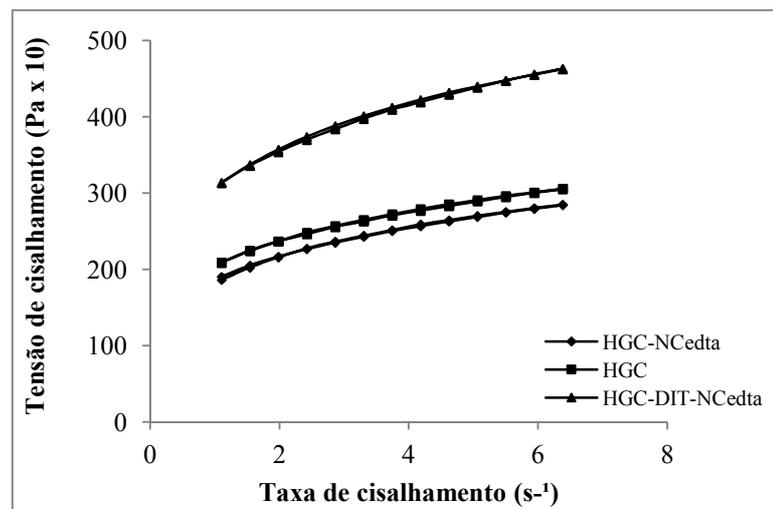


Figura 11 – Reogramas dos hidrogéis de Carbopol[®] 940.

A análise dos reogramas indicou que os hidrogéis preparados com Carbopol[®] 940 não apresentaram tixotropia (Figura 11). Ao contrário, os hidrogéis de Aristoflex[®] AVC demonstraram este tipo de comportamento, com exceção do hidrogel base com EDTA (Figura 12). Este fenômeno caracteriza-se pela diminuição da viscosidade em função do tempo, sendo uma propriedade desejável nas preparações farmacêuticas, uma vez que produtos tixotrópicos geralmente apresentam fácil remoção do material de acondicionamento e melhor espalhabilidade no local de aplicação (AULTON, 2005).

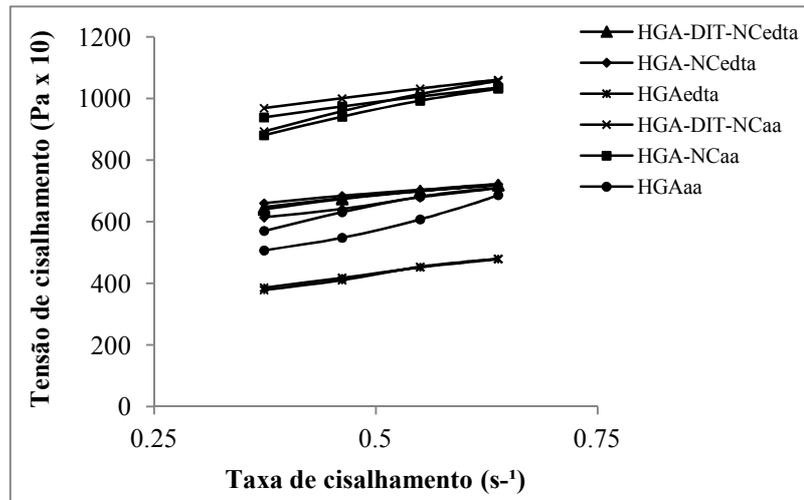


Figura 12 – Reogramas dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC.

Nos sistemas não-newtonianos os fluidos podem apresentar diferentes tipos de comportamento de fluxo, podendo ser caracterizados como plásticos, pseudoplásticos e dilatantes (KIM et al., 2003). Os reogramas obtidos foram analisados de acordo com quatro modelos: Bingham, Casson, Ostwald e Herschel-Bulkley. Os resultados obtidos a partir desta modelagem se encontram descritos na tabela 15.

Tabela 15 – Coeficientes de regressão (r^2) obtidos na modelagem matemática dos hidrogéis para descrever as curvas de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento (média \pm s)

Formulação	Binghan	Casson	Ostwald	Herschel-Bulkley
HGC-DIT-NC _{EDTA}	0,982 \pm 0,00	0,995 \pm 0,00	0,993 \pm 0,00	0,996 \pm 0,00
HGC-NC _{EDTA}	0,979 \pm 0,00	0,995 \pm 0,00	0,996 \pm 0,00	0,998 \pm 0,00
HGC _{EDTA}	0,985 \pm 0,00	0,994 \pm 0,00	0,993 \pm 0,00	0,995 \pm 0,00
HGA-DIT-NC _{EDTA}	0,993 \pm 0,00	0,997 \pm 0,00	0,995 \pm 0,00	0,997 \pm 0,00
HGA-NC _{EDTA}	0,981 \pm 0,00	0,991 \pm 0,00	0,982 \pm 0,00	0,767 \pm 0,00
HGA _{EDTA}	0,987 \pm 0,01	0,994 \pm 0,00	0,987 \pm 0,01	0,989 \pm 0,01
HGA-DIT-NC _{AA}	0,980 \pm 0,01	0,990 \pm 0,01	0,981 \pm 0,01	0,795 \pm 0,19
HGA-NC _{AA}	0,981 \pm 0,00	0,991 \pm 0,00	0,982 \pm 0,00	0,767 \pm 0,00
HGA _{AA}	0,964 \pm 0,03	0,982 \pm 0,01	0,963 \pm 0,03	0,803 \pm 0,28

Para as formulações preparadas com Carbopol[®] 940, o modelo de Herschel-Bulkley foi o que apresentou maior correlação. Após estabelecer o modelo, os parâmetros de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) foram calculados (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores de índice de fluxo (n), índice de consistência (k) e fator de espalhabilidade (FE) calculados para os hidrogéis de Carbopol[®] 940 (média \pm s)

Formulação	n	k (mPa.s)	FE (mm ² /g)
HGC-DIT-NC _{EDTA}	0,25 \pm 0,05	27121 \pm 8467	2,92 \pm 0,08
HGC-NC _{EDTA}	0,24 \pm 0,02	18482 \pm 1681	5,91 \pm 0,57
HGC _{EDTA}	0,24 \pm 0,06	16923 \pm 5473	6,81 \pm 0,73

Todos os hidrogéis apresentaram índices de fluxo menores que 1, indicando o comportamento pseudoplástico de tais formulações (CHHABRA; RICHARDSON, 2008). Os sistemas pseudoplásticos são caracterizados pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003). Sob influência de uma tensão, as moléculas tendem a tornar-se desembaraçadas e alinhar-se na direção do fluxo. Dessa forma, irão oferecer menos resistência ao fluxo e, esse fato, aliado a liberação de água que estava aprisionada, contribui para a diminuição da viscosidade (AULTON, 2005). Cabe salientar que outros trabalhos descrevem o comportamento pseudoplástico de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas utilizando Carbopol[®] 940 (ALVES, POHLMANN; GUTERRES, 2005; PAESE, et al., 2009; TERROSO, et al., 2009) e Carbopol Ultrez[®] 10 NF (FONTANA, et al., 2011; OURIQUE et al., 2011), bem como o modelo de Herschel-Bulkley sendo o mais adequado para descrever o fluxo das preparações (FONTANA et al., 2011; OURIQUE et al., 2011).

No que se refere aos valores de índices de fluxo e consistência, diferenças significativas não foram observadas ($p > 0,05$) entre as formulações contendo as nanocápsulas com ditranol (HGC-DIT-NC_{EDTA}), comparadas com as nanocápsulas brancas (HGC-NC_{EDTA}) e o hidrogel base (HGC_{EDTA}), demonstrando que a presença do fármaco e das nanocápsulas não alterou estes parâmetros.

Os géis com Aristoflex[®] AVC apresentaram uma maior correlação para o modelo de Casson, caracterizado por apresentar uma tensão de cisalhamento mínima (valor de cedência) para iniciar o fluxo, e a viscosidade do produto. Estes parâmetros foram calculados e estão demonstrados na tabela 17.

Tabela 17 – Valores de viscosidade (η), valor de cedência (τ_0) e fator de espalhabilidade (FE) calculados para os hidrogéis de Aristoflex[®] AVC (média \pm s)

Formulação	η (mPa.s)	τ_0 (Pa)	FE (mm²/g)
HGA-DIT-NC _{EDTA}	6314 \pm 3163	42,92 \pm 7,40	5,54 \pm 0,63
HGA-NC _{EDTA}	7885 \pm 3441	39,60 \pm 2,86	6,17 \pm 0,49
HGA _{EDTA}	16203 \pm 847	14,02 \pm 4,60	7,91 \pm 0,82
HGA-DIT-NC _{AA}	9356 \pm 790	57,12 \pm 7,24	5,20 \pm 0,34
HGA-NC _{AA}	11479 \pm 612	55,90 \pm 1,51	4,19 \pm 1,01
HGA _{AA}	32237 \pm 1128	15,61 \pm 6,50	5,84 \pm 0,14

A partir dos resultados, se verificou que houve uma diminuição significativa da viscosidade com a adição das nanocápsulas ao hidrogel base ($p < 0,05$), tanto para as formulações com EDTA como para as de ácido ascórbico; entretanto, a presença do fármaco não alterou este parâmetro ($p > 0,05$). Da mesma forma, maiores valores de valor de cedência foram obtidos para os hidrogéis contendo as nanocápsulas (HGA-DIT-NC_{EDTA}, HGA-NC_{EDTA}, HGA-DIT-NC_{AA} e HGA-NC_{AA}) em comparação aos hidrogéis base (HGA_{EDTA} e HGA_{AA}); entretanto, a presença do ditranol não ocasionou mudanças significativas entre as formulações contendo as nanocápsulas ($p > 0,05$).

A espalhabilidade é uma característica importante a ser avaliada no desenvolvimento de formulações semissólidas, pois verifica a capacidade da formulação espalhar sobre uma superfície, relacionada com a sua aplicação no local desejado (GARG et al., 2002). Neste trabalho, o método das placas paralelas foi utilizado para a avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis (GARG et al., 2002), representada em termos de fator de espalhabilidade. Os resultados obtidos estão representados na figura 13 e 14 e nas tabelas 16 e 17.

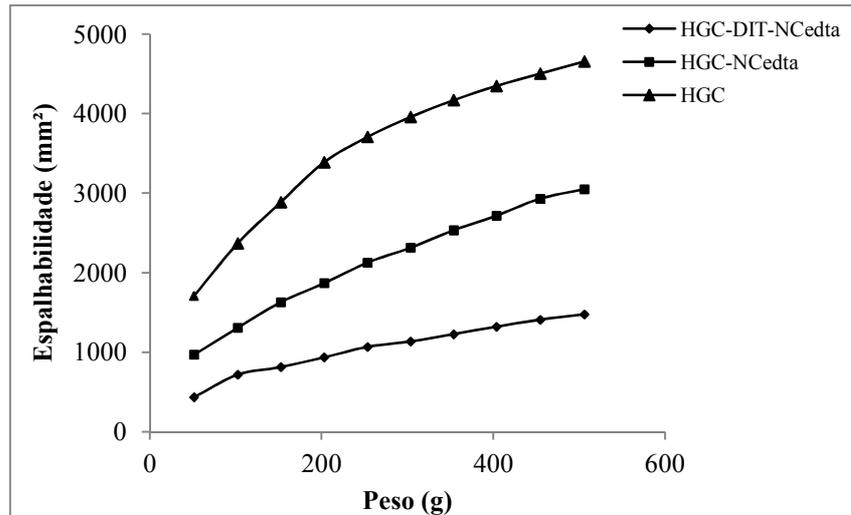


Figura 13 – Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Carbopol® 940 em função do peso adicionado (g).

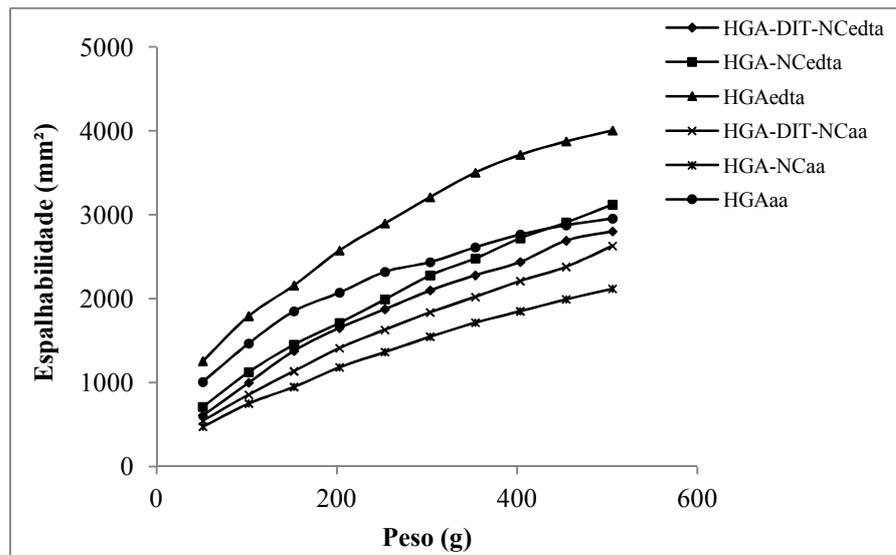


Figura 14 – Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Aristoflex® AVC em função do peso adicionado (g).

A representação gráfica da espalhabilidade *versus* peso demonstrou perfis semelhantes entre as formulações e que a incorporação das nanocápsulas aos hidrogéis base não modificou seu comportamento. Em relação ao fator de espalhabilidade, diferenças significativas entre as formulações foram verificadas. Para os hidrogéis de Carbopol® 940 uma menor área de espalhabilidade por unidade de peso (g) foi verificada para as formulações contendo as

nanocápsulas de ditranol em comparação com o hidrogel contendo as nanocápsulas brancas e o hidrogel base ($p < 0,05$), demonstrando que a presença do fármaco nas nanocápsulas influenciou significativamente este parâmetro (Tabela 16). A diminuição da espalhabilidade de hidrogéis com a adição de nanocápsulas poliméricas já foi observada em outros estudos com Carbopol Ultrez[®] 10NF (MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011), onde se atribui este fenômeno pela presença do polímero (1%). A ausência de tixotropia também pode estar relacionada com a menor espalhabilidade encontrada para esta formulação, já que formulações com valores baixos de tixotropia apresentam baixa espalhabilidade (MARTIN, 1993; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

Resultados semelhantes foram obtidos para os hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo EDTA em relação ao hidrogel base (Tabela 17 e Figura 14), onde se observou uma diminuição do fator de espalhabilidade com a adição dos sistemas nanoestruturados, sendo menor no hidrogel contendo o fármaco (HGA-DIT-NC_{EDTA}); porém, diferenças significativas não foram verificadas entre os hidrogéis contendo nanocápsulas de ditranol e nanocápsulas brancas ($p > 0,05$). Por outro lado, os hidrogéis contendo ácido ascórbico na sua composição apresentaram valores de fator de espalhabilidade semelhantes entre si, demonstrando que a presença das nanocápsulas não mudou significativamente este parâmetro em relação ao hidrogel base ($p > 0,05$).

A determinação da espalhabilidade tem por objetivo avaliar a expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após determinado período de tempo, relacionando com a aplicação desta no local desejado (GARG et al., 2002). Desta forma, dependendo do local e da extensão das lesões da psoríase, uma maior ou menor espalhabilidade das formulações são desejadas. A formulação de Carbopol[®] 940 (HGC-DIT-NC_{EDTA}) apresentou uma menor espalhabilidade e um maior valor de índice de consistência, podendo ser indicada em lesões menos extensas da doença, como a palma das mãos ou a planta dos pés. Já as formulações de Aristoflex[®] AVC (HGA-DIT-NC_{EDTA} e HGA-DIT-NC_{AA}) apresentaram espalhabilidade e viscosidade semelhantes ($p > 0,05$) entre si, porém maiores do que a formulação de Carbopol[®] 940, assim a sua utilização pode ser indicada em regiões mais extensas, como tronco, pernas e costas.

4.5 Estabilidade dos hidrogéis

Os hidrogéis de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol e EDTA ou ácido ascórbico apresentaram resultados satisfatórios na sua caracterização e foram avaliados em relação à estabilidade durante o armazenamento, a temperatura ambiente. As formulações foram analisadas em relação ao teor de fármaco (30 dias). Para comparação, hidrogéis contendo o fármaco livre foram, também, avaliados. Na figura 15 estão representadas as concentrações de ditranol verificadas durante o estudo.

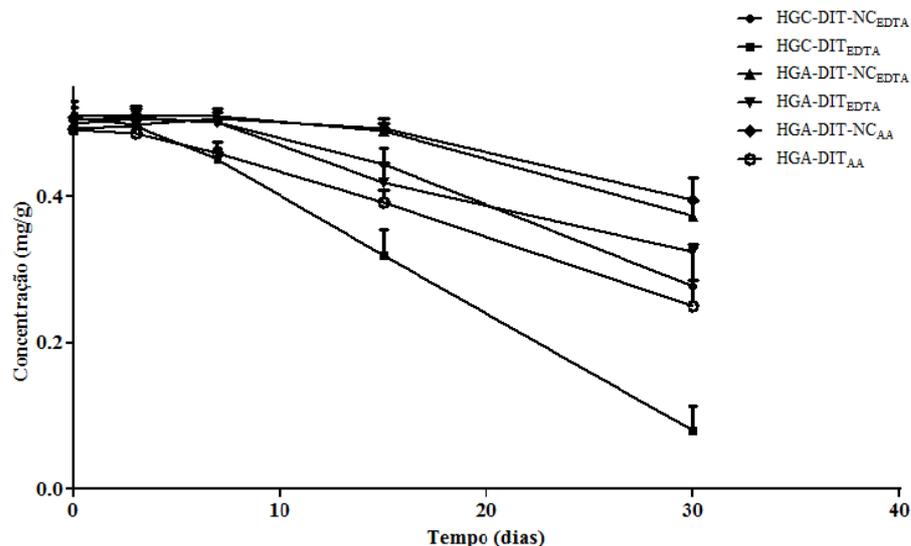


Figura 15 – Concentração de ditranol (mg/g) em função do tempo verificadas no estudo de estabilidade do ditranol em hidrogéis contendo nanocápsulas (HGC-DIT-NC_{EDTA}, HGA-DIT-NC_{EDTA} e HGA-DIT-NC_{AA}) e o fármaco livre (HGC-DIT_{EDTA}, HGA-DIT_{EDTA} e HGA-DIT_{AA}), obtidos por CLAE (média \pm s).

Os hidrogéis de Carbopol[®] 940 contendo as nanocápsulas (HGC-DIT-NC_{EDTA}) mantiveram cerca de 100% o teor de fármaco após sete dias de armazenamento, enquanto que o hidrogel com o fármaco livre (HGC-DIT_{EDTA}) apresentou 90% de teor no mesmo tempo de análise. Em 15 dias, o hidrogel com as nanocápsulas de EDTA e o fármaco, ainda estavam com teor aceitável preconizado pela Farmacopéia Britânica (2010) de 88,94%, enquanto que o hidrogel com o fármaco livre apresentou um teor de 63,83%. Essa diferença de concentração

aumentou com o decorrer do tempo e após 30 dias, um decaimento de, aproximadamente, 45 e 84% da concentração inicial de ditranol foi verificada para as formulações HGC-DIT-NC_{EDTA} e HGC-DIT_{EDTA} (0,28 e 0,08 mg/mL, respectivamente). Comparando estes resultados com as suspensões de nanocápsulas (teor de 0,38 mg/mL após sete dias de armazenamento), se verificou uma maior estabilidade para os hidrogéis, possivelmente, em função da presença de metabissulfito de sódio nas formulações, estabilizando, por um período de tempo maior, o ditranol.

Em relação aos hidrogéis preparados com Aristoflex[®] AVC e EDTA se verificou uma maior estabilidade quando comparados às formulações com Carbopol[®] 940, os quais se mantiveram estáveis por 15 dias de armazenamento a temperatura ambiente (teores próximos a 100%); após 30 dias, o teor de fármaco foi de 74% para a formulação HGA-DIT-NC_{EDTA} e 55% para o hidrogel HGC-DIT-NC_{EDTA}. Da mesma forma, as formulações com ditranol livre (HGA-DIT_{EDTA} e HGC-DIT_{EDTA}) apresentaram um teor de ditranol de 65 e 15%, respectivamente, após 30 dias de armazenamento. Os valores de pH mais baixos podem ter auxiliado na estabilização do fármaco, além da diferente estrutura do polímero e da ausência de trietanolamina, que é uma base que alcaliniza o meio, proporcionando uma maior reatividade ao fármaco, desestabilizando-o. Da mesma forma, uma maior estabilidade para os hidrogéis foi verificada em relação à suspensão de nanocápsulas (teores de 100 e 50% para o hidrogel e a suspensão de nanocápsulas, respectivamente).

Os hidrogéis mais estáveis foram os compostos por Aristoflex[®] AVC com nanocápsulas de ditranol e ácido ascórbico. Estas suspensões já haviam demonstrado maior estabilidade em relação às contendo EDTA, e estes resultados foram corroborados com a análise dos hidrogéis. O hidrogel HGA-DIT-NC_{AA}, após 15 dias, apresentou cerca de 100% de fármaco; após 30 dias, um teor de 80% (0,39 ± 0,03 mg/g) foi verificado em relação à concentração inicial de ditranol. Comparando este resultado com a suspensão de nanocápsula (DIT-NC_{AA}, teor de, aproximadamente, 70%), uma maior estabilidade para o hidrogel foi observada. Cabe salientar que uma variação no doseamento do fármaco de 85 a 110% é preconizado pela Farmacopéia Britânica (2010) para cremes, pomadas e pastas contendo ditranol.

Comparando os resultados obtidos com os hidrogéis contendo o fármaco livre (não associado) se verificou uma maior estabilidade para as formulações contendo as nanocápsulas, demonstrando, novamente, a importância das nanocápsulas em proteger o fármaco.

A obtenção de hidrogéis contendo outros nanocarreadores é reportada na literatura. Saraswat e colaboradores (2002) desenvolveram hidrogéis contendo ditranol associado a lipossomas. As formulações propostas demonstraram maior eficácia, menor irritação do fármaco após aplicação e uma diminuição de manchas e maior facilidade de lavagem em tecidos. Entretanto, não há relato de um estudo de estabilidade com esta formulação. Nanopartículas lipídicas sólidas de ditranol foram, também, incorporadas em géis (gel e gel-creme, contendo 0,015% de ditranol) por Carlotti e colaboradores (2009) e avaliadas em relação a sua estabilidade. As formulações foram armazenadas a temperatura ambiente e após quatro dias, o teor de fármaco obtido foi de 8%, caindo para zero após oito dias. Uma maior estabilidade foi verificada para o gel-creme, o qual apresentou um teor de fármaco de 51% após oito dias de armazenamento.

A partir dos resultados obtidos foi demonstrada a possibilidade de preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico de ditranol e sua inclusão em hidrogéis, sendo necessária a utilização de substâncias antioxidantes para melhorar a estabilidade do fármaco nas suspensões aquosas e nas preparações semissólidas. Além disso, o emprego de Aristoflex[®] AVC na preparação dos hidrogéis demonstrou resultados satisfatórios em relação à estabilidade do fármaco, bem como a possibilidade de inclusão das nanocápsulas preparadas com ácido ascórbico.

Considerando-se o conjunto de resultados, sugere-se que os hidrogéis de Aristoflex[®] AVC, preparados a partir das nanocápsulas contendo EDTA e ácido ascórbico, poderiam ser utilizados na continuidade deste trabalho. Como perspectivas pode-se citar: estudo de liberação do fármaco a partir das formulações desenvolvidas; avaliação da estabilidade dos hidrogéis em baixas temperaturas de armazenamento; avaliação da citotoxicidade em culturas de células.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Neste trabalho, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ditranol foram preparadas, as quais apresentaram características físico-químicas satisfatórias (tamanho nanométrico e alta eficiência de encapsulamento). A utilização de EDTA e de ácido ascórbico foi necessária para a estabilidade do fármaco, sendo que as nanocápsulas contendo ácido ascórbico apresentaram melhor estabilidade frente ao armazenamento.
- Nanoemulsões contendo ditranol foram, também, preparadas e avaliadas, as quais apresentaram um baixo teor de fármaco após preparação, demonstrando a importância da parede polimérica nas nanocápsulas em proteger o fármaco durante o processo de produção das nanoestruturas.
- As nanocápsulas aumentaram a fotoestabilidade do ditranol frente à luz UVA quando comparada à solução do fármaco livre.
- No modelo de irritação utilizado neste trabalho, as nanocápsulas demonstraram ser não irritantes, ao contrário da dispersão do fármaco livre, a qual foi classificada como muito irritante, demonstrando a importância da nanoencapsulação do fármaco em minimizar seus efeitos adversos.
- Hidrogéis de Carbopol[®] 940 e Aristoflex[®] AVC contendo ditranol nanoencapsulado foram desenvolvidos, os quais apresentaram características adequadas, possibilitando sua utilização como veículos aquosos na obtenção de formulações semissólidas contendo ditranol.
- No que se refere às características reológicas, os hidrogéis de Carbopol[®] 940 e Aristoflex[®] AVC apresentaram comportamento de fluxo pseudoplástico e plástico, respectivamente.
- Os hidrogéis contendo as nanocápsulas possibilitaram aumentar a estabilidade do fármaco em comparação com o hidrogel com o fármaco livre (não associado às nanocápsulas). Além disso, uma maior estabilidade para os hidrogéis de Aristoflex[®]

AVC foi verificada, preparados a partir das nanocápsulas de ditranol com EDTA e ácido ascórbico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, R.; KATARE, O. P.; VYAS, S. P. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niossomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 43-52, 2001.
- AGARWAL, R.; SARASWAT, A.; KAUR, I.; KATARE, O. P.; KUMAR, B. A novel liposomal formulation of dithranol for psoriasis: Preliminary results. **Journal of Dermatology**, v. 29, n. 8, p. 529-532, 2002.
- ALKHALIFAH, A.; ALSANTALI, A.; WANG, E.; MCELWEE, K. J.; SHAPIRO, J. Alopecia aerate update: Part II Treatment. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 62, p. 191-202, 2010.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.
- ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900-904, 2005.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distributio of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- ANTON, N.; BENOIT. J. P.; SAULNIER, P. Desing and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899, Brasil, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Ed 17, Gaithersburg, MD, 2000, v. 1.
- ARAÚJO, J.; VEGA, E.; LOPES, C.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 48-56, 2009.

ARRUDA, L. H. F.; CAMPBELL, G. A. M.; TAKAHASHI M. D. F. Psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, p. 141-167, 2001.

ASHCROFT, D. M.; LIWAN PO, A.; GRIFFITHS, E. M. Therapeutic strategies for psoriasis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 25, p. 1-10, 2000.

ASHTON, R. E.; LOWE, N. J.; WHITEFIELD, M. Anthralin: Historical and current perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 9, p. 173-192, 1933.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2 ed., 2005, p. 112-123.

BASAVARAJ, K.; H.; NAVYA, M. A.; RASHMI, R. Stress and quality of life in psoriasis: an update. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 783-792, 2011.

BÉRARD, F.; NICOLAS, J-F. Physiopathologie du psoriasis. **Annales de dermatologie et de vénereologie**, v. 130, p. 837-842, 2003.

BEUTNER, K. R.; BHUSHAN, R. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 826-850, 2008.

BLANCO, M. D.; ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, p. 287-294, 1997.

BLOCK, L. H. Medicação tópica. In **Remington: the science and practice of pharmacy**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ed. A. R. GENARO, 2004, pp 862-884.

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. 531-537, 2006.

BOS, J. D.; RIE, M. A. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. **Immunology Today**, n. 1, v. 20, p. 40-46, 1999.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET, I.; ZYDOWICZ. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 89-100, 2004.

BP, 2010. BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010.

CARLOTTI, M. E., SAPINO, S., PEIRA, E., GALLARATE, M., UGAZIO, E. On the photodegradation of dithranol in different topical formulations: use of SLN to increase the stability of the drug. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, p. 1517-1524, 2009.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOME, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116-124, 2010.

CHEACH, I. C. L.; SITARAM, B. R.; PAPPAS, A.; THI, N. L.; FINNIN, B. C.; REED, B. L. Normal phase and reversed-phase liquid chromatographic techniques for the determination of dithranol and its degradation products. **Journal of Chromatography**, v.467, p. 414-422, 1989.

CHHABRA, R. P.; RICHARDSON, J. F. **Non-newtonian flow and applied rheology: engineering applications**. 2 ed, p. 5-12, 2008.

CHRISTOPHERS, E. Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. **Clinical Experimental Dermatology**, v.26, p. 314-20, 2001.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.313, p. 198-205, 2006.

CZERWINSKA, M.; SIKORA, A.; SZAJERSKI, P.; ZIELONKA, J.; ADAMUS, J.; MARCINEK, A. Anthralin: Primary products of its redox reactions. **Journal Organic Chemistry**, v. 27, p. 5312-5319, 2006.

DATE, A.A.; NAIK, B.; NAGARSENKER, M. S. Novel drug delivery systems: potential in improving topical delivery for antiacne agents. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 2-16, 2006.

DELNEUVILLE, I.; DECHESNE, J. P.; DELATTRE, L. Preparation and study of the characteristics of dithranol: polyvinylpyrrolidone coevaporates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, p. 109-118, 1998.

DETONI, B. C.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913-921, 2012.

DRAIZE, J.; WOODARD, G.; CALVERY, H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 377-390, 1944.

EUN, H. C.; SUH, D. H. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, p. 77-91, 2000.

FARAJI, A.H., WIPF, P. Nanoparticles in Cellular Drug Delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 2950-2962, 2009.

FELIPPI, C. C.; OLIVEIRA, D.; STROHER, A.; CARVALHO, A. R.; VAN ETTEN, E. A. A. M.; BRUSCHI, M.; RAFFIN, R. P. Safety and Efficacy of Antioxidants-Loaded Nanoparticles for an Anti-Aging Application. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 316-321, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drug through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, p. 417-425, 2000.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructure system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254, 2009.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FUCHS, J.; ZIMMER, G.; WÖLBLING, R. H.; MILBRADT, R. On the interaction between anthralin and mitochondria: a revision. **Archives of Dermatology**, v. 279, p. 59-65, 1986.

GALADARI, I.; SHARIF, M. O.; GALADARI, H. Psoriasis: a fresh look. **Clinics in Dermatology**, n. 23, p. 491-502, 2005.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84-105, 2002.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the spf of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, n.1, v.250, p. 35-44, 2003.

GEHRING, W.; GHYCZY, M.; GLOOR, M.; SCHEER, T.; RODING, J. Enhancement of the penetration of dithranol and increase of effect of dithranol on the skin by liposomes. **Arzneimittel Forschung/Drug Research**, v. 42, p. 983-985, 1992.

GEHRING, W.; KLEIN, W.; GLOOR, M. Liposome als träger von dithranol bei der behandlung der psoriasis vulgaris. **Zeitschrift fur Hautkrankheiten**, v. 69, p. 451-453, 1994.

GIDWANI, S. K.; SINGNURKAR, P. S. Composition for delivery of dithranol. **United States Patent Application Publication**, US 2003/0219465 A1, 2003.

GIL, E.; BRANDÃO, A. L. **Excipientes: suas aplicações e controle físico-químico**. São Paulo: Pharmabooks, 2 ed., 2007. p. 176-177.

GINSBURG, I. H.; LINK, B.G. Psychosocial consequences of rejection and stigma feelings in psoriasis patients. **International Journal of Dermatology**, v. 32, p. 587-591, 1993.

GOODFIELD, M. J. D.; HULL, S. M.; CUNLIFFE, W. J. The systemic effect of dithranol treatment in psoriasis. **Acta Derm Venereol (Stockholm)**, v. 74, p. 295-297, 1994.

GUENTHER, U.; SMIRNOVA, I.; NEUBERT, R. H. H. Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems – Dithranol as a model drug. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 935-942, 2008.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R. K. ALI, A. BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, p.409-417, 2011.

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.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 141-158, 1993.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HILLER, C.; CAMPBELL, C.; SMEATON, I. How stable is dithranol? An investigation into the degradation of different dithranol formulations. **Pharmacy Practice**, v. 5, p. 428-431, 1995.

International Conference on Harmonization (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Q2 (R1), 2005.

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

JAGER, E.; VETURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedicine and Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

KALIA, Y.; GUY, R. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 48, p. 159-172, 2001.

KATARE, O. P.; AGARWAL, R.; KUMAR, B. Novel inter and intra multilamellar vesicular composition. **United States Patent Application Publication**, US 2008, 0171795 A1, Jul. 17, 2008.

KEMÉNY, L.; RUZICKA, T.; BRAUN-FALCO, O. Dithranol: A review of the mechanism of action in the treatment of psoriasis vulgaris. **Skin Pharmacology**, v. 3, p.1-20, 1990.

KIM, D. Y.; RHEE, Y. H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 300-308, 2003.

KIM, J.; SONG, J.; LEE, E.; PARK, S. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, p. 614-623, 2003.

KIRKUP, M. E.; SABROE, R. A.; KAVANAGH, G. M.; DOWNS, A. M. R.; SANSOM, J. E.; BERKER, D. A. R.; DUNNILL, M. G. S.; KENNEDY, C. T. C.; ARCHER, C. B. Twice-daily vs. once-daily inpatient dithranol for psoriasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 695-699, 2002.

KNECZKE, W.; RAHM, C.; LANDERSJO, L.; LUNDGREN, P. In vitro release of anthralin from white petrolatum and an o/w cream. **Acta Pharmaceutica Nordica**, v. 1, p. 249-258, 1989.

KORMEILI, T.; LOWE, N. J.; YAMAUCHI, P.S. Psoriasis: immunopathogenesis and evolving immunomodulators and systemic therapies; U.S. experiences. **British Journal of Dermatology**, v. 151, p. 3-15, 2004.

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.

KWON, H-Y.; LEE, J-Y.; CHOI, S-W.; JANG, Y.; KIM, J-H. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. **Colloids and Surfaces**, v. 182, p. 123-130, 2001.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LADERMANN, J. RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIB, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W.

Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 159-164, 2007.

LANGLEY, R.G.; KRUEGER, G.G.; GRIFFITHS, C.E. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Annals of Rheumatic Disease**, v.64, n.2, p.18-23, 2005.

LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. 2008. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LAU, W. M.; WHITE, A. W.; HEARD, C. M. Topical Delivery of a Naproxen-Dithranol Co-drug: In Vitro Skin Penetration, Permeation, and Staining. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p.2734-2742, 2010.

LEIGHTON, J.; NASSAUER, J.; TCHAO, R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, p. 293–298, 1985.

LENZ, Q. F.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.; ALVES, M. P. Semi-solid topical formulations containing nimesulid-loaded nanocapsules showed in-vivo anti-inflammatory activity in chronic arthritis and fibrovascular tissue models. **Inflammation Research**, v. 61, p. 305-310, 2012.

LOWES, M.A.; BOWCOCK, A.M.; KRUEGER, J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v. 445, p. 866-873, 2007.

LOWES, M.A.; KIKUCHI, T.; FUENTES-DUCULAN, J.; CARDINALE, I.; ZABA, L.C.; HAIDER, A. S. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p.1207-1211, 2008.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M. SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 190-197, 2006.

LUPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MAHRLE, G. Dithranol. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 723-737, 1997.

MARCHIORI, M. L., LUBINI, G., G. DALLA NORA, G., FRIEDRICH, R. B., FONTANA, M. C., OURIQUE, A. F., BASTOS, M. O., RIGO, L. A., SILVA, C. B., TEDESCO, S. B., BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparations, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 962-971, 2010.

MARTIN, A. *Physical Pharmacy*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 153-476.

MARTINS, G. A.; CHAUL, A. **Tratamento tóxico da psoríase**. Consenso Brasileiro de Psoríase, p. 41-48, 2009.

MARTINS, T.; PAULUHN, J.; MACHEMER, M. Analysis of alternative methods for determining ocular irritancy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, p. 1061-1068, 1992.

MCGILL, A.; FRANK, A.; EMMETT, N.; LEECH, S. N.; TURNBULL, D. M.; BIRCHMACHIN, M. A.; REYNOLDS, N. J. The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. **The FASEB Journal**, p. 1-28, 2005.

MENTER, A.; GOTTLIEB, A.; FELDMAN, S. R.; VAN VOORHEES, A.S.; LEONARDI, C. L.; GORDON, K.B.; LEBWOHL, M.; KOO, J. Y.; ELMETS, C.A.; KORMAN, N.J.; MU, L.; SEON, P. H.; ANG, S. -H.; FENG, S. -S. Study on surfactant coating of polymeric nanocapsules for controlled delivery of anticancer drug. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, p. 58, 2004.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A. CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 649-657, 2007.

MILAO, D.; KNORST, M. T.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physic-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-329, 2003.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHINSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 238-245, 2003.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; Y, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 270-276, 2008.

MU, L.; SEOW, P-H.; ANG, S-N.; FENG, S-S. Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. **Colloids and Polymer Science**, v. 283, p. 58-65, 2004.

MULLER, K. Antipsoriatic Anthrones: aspects of oxygen radical formation, challenges and prospects. **General Pharmacology**, v. 27, n. 8, p. 1325-1335, 1996.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-167, 2000.

NEILL, S. M.; BUGREIN, A.; COULSON, I. H.; GREAVES, M. W. Toxicologic study of anthralin in an aqueous cream formulation. **Cutis**, v. 34, p. 563-566, 1984.

NEUBERT, R.; WOHLRAB, W.; BENDAS, C. Modelling drug penetration into human skin using a multilayer membranes system. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.8 (3), p. 119-129, 1995.

NIEMEIER, V.; NIPPENSEN, M.; KUPFER, J. Psychological factors associated with hand dermatoses: which subgroup needs additional psychological care? **British Journal of Dermatology**, v.146, p. 1031–1037, 2002.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.p. 6-10; 45-61; 78-89.

ORTONNE, J. P. Aetiology and Pathogenesis of psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 135, Suppl 49, p.1-5, 1996.

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.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Lipid-core nanocapsules as a

nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 6, p. 214-223, 2010.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A. SILVA, C. S.; SCHAEFER, U. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C-M.; KOSTKA, K-H.; BECK, R. C. R. 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.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F. S.; FONSECA, E. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: Effectiveness, in vitro photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 240-246, 2009.

PALMA, S. Vehiculización de Antralina en Coageles de n-alquil derivados del Ácido Ascórbico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 4, p. 305-312, 2003.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PARSLEW, R.; FRIEDMANN, P. S. The irritancy of anthralin is inhibited by repeat applications of a subirritant concentration. **British Journal of Dermatology**, v. 141, p. 469-474, 1999.

PATRA, J.; SAHOO, M. K.; PANDA, B.B. Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental**, v. 581, p. 173-180, 2005.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S.; GENTA, I.; MODENA, T.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 246, p. 37-45, 2002.

PETTEY, A.A.; BALKRISHNAN, R.; RAPP, S.R. et al. Patients with palmoplantar psoriasis have more physical disability and discomfort than patients with other forms of psoriasis: implications for clinical practice. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, p. 271-275, 2003.

PHARMA SPECIAL, informativo técnico. Acessado em 29 de julho de 2012
http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/lit_aristoflex_avc.pdf

PRINS, M. SWINKELS, O. Q. J.; KOLKMAN, E. G. W.; WUIS, E. W.; HEKSTER, Y. A.; VAN DER VALK, P. G. M. Skin irritation by dithranol cream. **Acta Dermatology Venereol (Stockholm)**, v. 78, p. 262-265, 1998.

RAAB, W. P. Ingram method: the precursor of photochemotherapy. **British Journal Dermatology**, v. 105, n. 20, p. 77-81, 1981.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006

RAZA, K.; NEGI, P.; TAKYAR, S.; SHUKLA, A.; AMARJI, B.; KATARE, O. P. Novel dithranol phospholipid microemulsion for topical application: development, characterization and percutaneous absorption studies. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 3, p. 190-199, 2011.

REICH, K. Approach to managing patients with nail psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology Venereology**, v.23, n.1, p. 15-21, 2009.

REICH, A.; HREHOROW, E.; SZEPIETOWSKI, J.C. Pruritus is an important factor negatively influencing the wellbeing of psoriatic patients. **Acta Dermato Venereologica**, v. 90, p. 257-263, 2010.

REICH, K.; BEWLEY, A. What is new in topical therapy for psoriasis? **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 4, p.15-20, 2011.

REICHERT, U.; JACQUES, Y.; GRANGERET, M.; SCHMIDT, R. Antirespiratory and antiproliferative activity of anthralin in cultured human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 130-134, 1985.

RENZI, C.; DI PIETRO, C.; TABOLLI, S. Participation, satisfaction and knowledge level of patients with CP or PA. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, n. 8, p. 885-888, 2011.

RODRIGUES, A. P.; TEIXEIRA, R. M. Desvendando a psoríase. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41 (4), p. 303-309, 2009.

SALET, C.; MORENO, P.; MORLIERE, P.; SANTUS, R. Effects of anthralin on mitochondrial bioenergetics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 283, p. 186-190, 1991.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Erupções Eritêmatos-escamosas. In: Sampaio SAP & Rivitti EA. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 3 ed. 2007. p. 227-246.

SARASWAT, A.; AGARWAL, R.; KAUR, I.; KATARE, O. P.; KUMAR, B. Fabric-staining properties and washability of a novel liposomal dithranol formulation. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 13, n. 3, p.119-122, 2002.

SARASWAT, A.; AGARWAL, R.; KATARE, O. M. P.; KAUR, I.; KUMAR, B. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study of a novel liposomal dithranol formulation in psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 18, p. 40-45, 2007.

SCHAEFER, H.; SCHALLA, W.; SHROOT, B. Anthralin – facts, trends and unresolved problems. **Zeitschrift fur Hautkrankheiten**, v. 146, p. 273-282, 1981.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHON, M.P.; HENNING, W.B. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v.352, p. 1899-1912, 2005.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R-M.; KARRER, S.; HEINLIN, J.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing . **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, p. 373-378, 2010.

SILVA, M. F. P. **Correlação entre parâmetros de gravidade clínica e histopatológica em pacientes com psoríase em placas antes e após tratamento sistêmico**. 2009. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2009.

SINKO, P. J. Chemical Kinetics and Stability. In: SINKO, P. J. **Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Baltimore: Martin's. 2006. p. 396-434.

SPIELMANN, H. Ocular Irritation. In: **In vitro methods in pharmaceutical research**, 1997, cap. 12, p. 265-287.

TAKAHASHI, D. Manifestações Clínicas, Diagnóstico, Diagnóstico Diferencial. In: **Consenso Brasileiro de Psoríase 2009**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, p. 23-27, 2009.

TALHARI, S.; RAMOS, A. M. C. **Consenso Brasileiro de Psoríase**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, anexo 1-3, 2006.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 819-826, 2009.

The Index Merck, 14^a ed. ISBN 0-911910-13-1, 2006.

THOMA, K.; HOLZMANN, C. Photostability of dithranol. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 26, p. 201-208, 1998.

TRENAM, C.W.; BLAKE, D.R.; MORRIS, C. J. Skin inflammation: Reactive oxygen species and the role of iron. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, p. 675-682, 1992.

VAN DE KERKHOFF, P.C.M.; VAN DER VALK, P.G.M.; SWINKELS, O.Q.J.; KUCHAREKOVA, M.; DE RIE, M.A.; DE VRIES, H.J.C.; DAMSTRA, R.; ORANJE, A. P.; DE WAARD-VANDER SPEK, F.B.; VAN NEER, P.; LIJNEN, R. L. P.; KUNKELER, A. C. M.; VAN HEES, C.; HAERTLEIN, N. G. J.; HOL, C. W. A comparison of twice-daily calcipotriol ointment with once-daily short-contact dithranol cream therapy: a randomized controlled trial of supervised treatment of psoriasis vulgaris in a day-care setting. **British Journal of Dermatology**, v. 155, p. 800-807, 2006.

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

VINARDELL, M. P.; MACIÁN, M. Comparative study of the Het-Cam test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 467-470, 1994.

WANG, J. C. T.; AMHERST, E. Compositions and method for stabilization of anthralin comprising the addition of an oil soluble antioxidant and an anionic surfactant. **United States Patent**, n. 5034420, Jul 23, 1991.

WANG, J. C.; PATEL, B. G.; EHMANN, C. W.;LOWE, N. The release and percutaneous permeation of anthralin products, using clinically involved and uninvolved psoriatic skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 812-821, 1987.

WEISS, S.C.; KIMBALL, A. B.; LIEWEHR, D. J.; BLAUVELT, A.; TURNER, M. L.; EMANUEL, E. J. Quantifying the harmful effect of psoriasis on health-related quality of life. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 4, p. 512–518, 2002.

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

WESTER, R.; MOBAYEN, M.; RYATT, K.; BUCKS, D.; MAIBACH, H. In vivo percutaneous resorption of dithranol in psoriatic patients and normal volunteers (abstr). **Clinical Research**, v. 86, p. 514, 1980.

WILSON, T. D.; STECK, W. F. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 867-872, 2000.

WOHLRAB, W. Möglichkeiten der Optimierung der Dithranoltherapie. **Zeitschrift für Hautkrankheiten**, v. 66, n. 2, p. 61-62, 1991.

WUIS, E. W.; BURGER, D. M.; BEELEN, M.; HEKSTER, Y. A. Stability of dithranol in creams. **Pharmacy World and Science**, v, 21, n. 6, p. 275-277, 1999.

YOSIPOVITCH, G.; GOON, A.; WEE, J.; CHAN, Y. H.; GOH, C. L. The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v.143, p. 969–973, 2000.

YOUNG, M. The psychological and social burdens of psoriasis. **Dermatology Nursing**, v. 17, p. 15–19, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICES

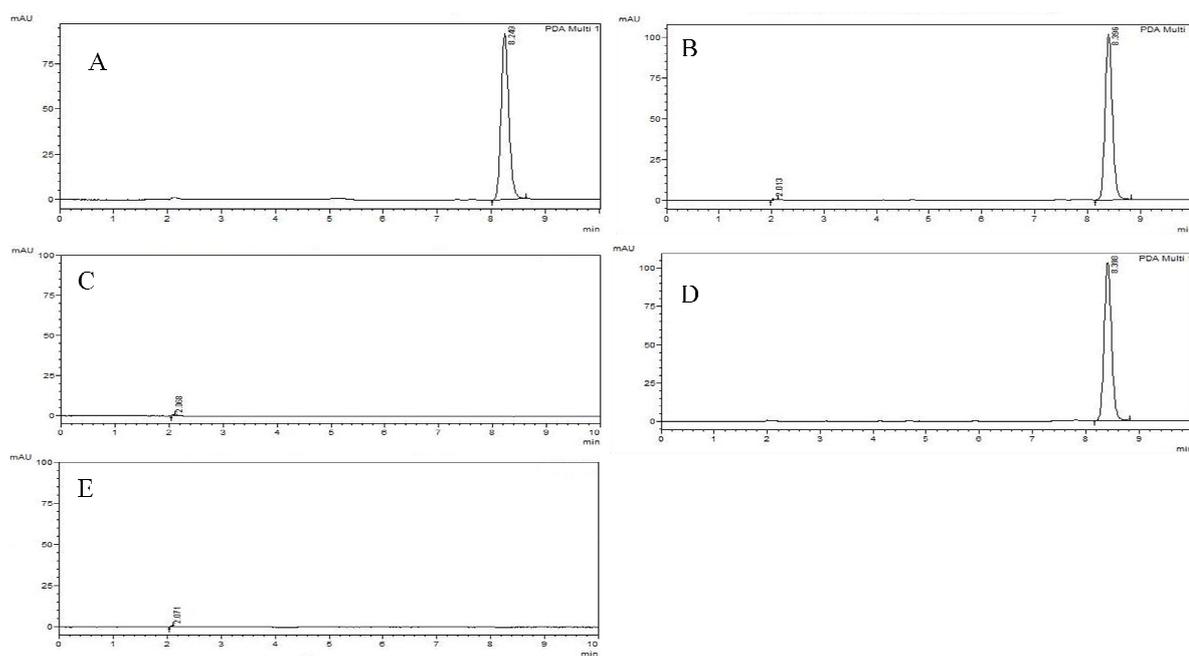
Apêndice A – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do ditranol nas nanocápsulas

Figura 1 – Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE. (A) solução de ditranol em acetonitrila (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (B) DIT-NC_{EDTA} (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (C) NC_{EDTA}; (D) DIT-NC_{AA} (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e (E) NC_{AA}.

Apêndice B – Fotoestabilidade

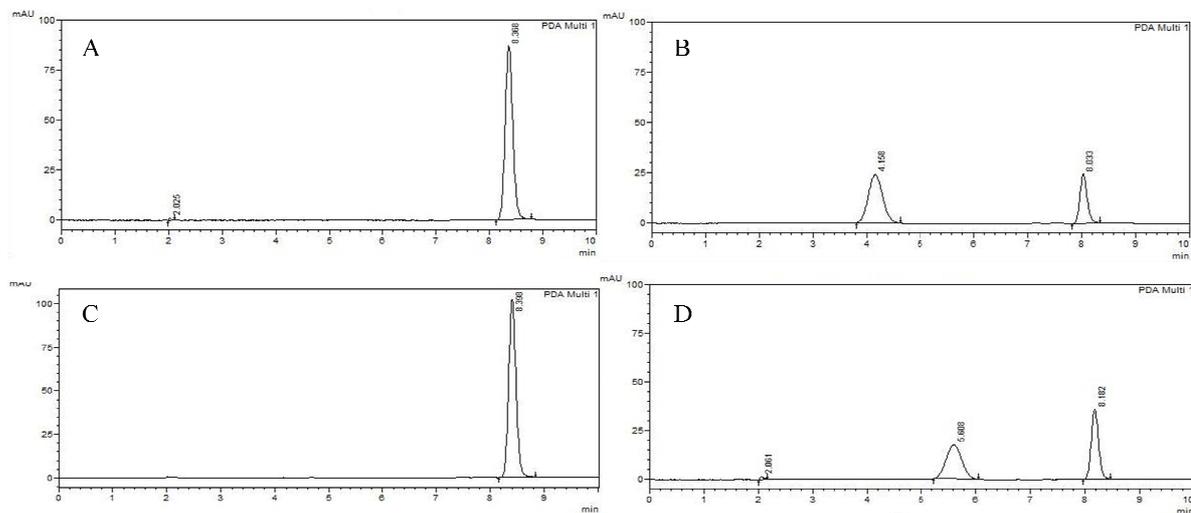


Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE no estudo de fotodegradação do ditranol: (A) Nanocápsulas de ditranol e EDTA no tempo zero e (B) após 5 horas de exposição; (C) nanocápsulas de ditranol e ácido ascórbico no tempo zero e (D) após 24 horas de exposição à luz UVA.

Apêndice C – Cromatogramas das soluções de trabalho utilizadas na quantificação do ditranol nos hidrogéis

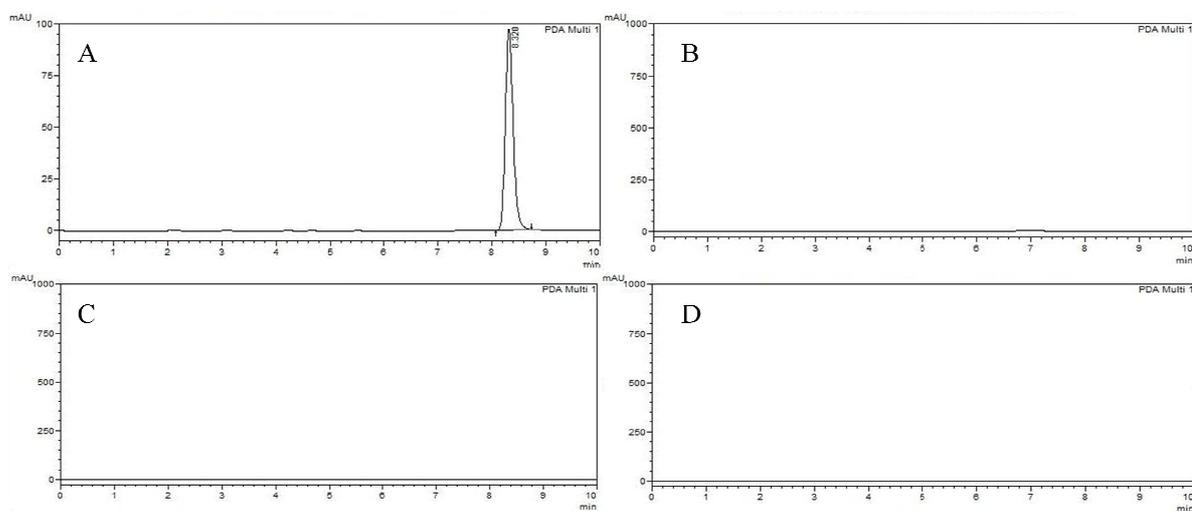


Figura 3 – Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE. (A) HGC-DIT-NC_{EDTA} (20 µg/mL); (B) HGC-NC_{EDTA}; (C) HGA-NC_{EDTA} e (D) HGA-NC_{AA}.