

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

**EMPREGO DO ÓLEO DE *Borago officinalis* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO
TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Julia Weber Schiavo

Santa Maria, RS, Brasil

2014.

**EMPREGO DO ÓLEO DE *Borago officinalis* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO
TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE**

Julia Weber Schiavo

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.**

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2014.**

**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

**EMPREGO DO ÓLEO DE *Borago officinalis* L. NO
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO
TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE**

elaborada por
Julia Weber Schiavo

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Ruy Carlos Ruver Beck, Dr. (UFRGS)

Maria Isabel de Ugalde Marques da Rocha, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de abril de 2014.

“Nossos sonhos podem
se transformar em realidade
se os desejarmos a ponto
de correr atrás deles”
(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Cláudia, pela confiança, conforto, ensinamentos de vida e apoio financeiro.

Ao meu padrasto, Joel, que junto com minha mãe me deram o suporte necessário para essa conquista, acreditando na minha capacidade e no meu trabalho. Além de serem exemplos de profissionais.

À minha família (vô, vó, tias e primos) pelo carinho e pelos momentos de risadas e distração.

À minha orientadora, Cristiane de Bona da Silva, por quem tenho grande admiração e felicidade por desde a graduação ter confiado projetos a mim. Pelos ensinamentos, ética profissional, amizade e atenção e carinho com que desenvolve seu trabalho conosco.

À minha “Equipe” (Márcia, Rô e Tai), sempre tão presente quando mesmo longe. Apoiando em todos os momentos, escutando minhas lamentações, vibrando com minhas conquistas, fazendo meus dias mais divertidos (via “Whats app”) e meus momentos de descontração inesquecíveis.

À IC mais mara, Nadine, minha companheira e cúmplice nessa caminhada de erros e acertos. Pela paciência, apoio, dedicação, responsabilidade, risadas, carinho e amizade.

Aos meus afilhados, Fê e Gabi, pela amizade, carinho e apoio, pelos tantos finais de semanas de jantas, almoços e descontração. Fê, pelas conversas, desabafos e trocas de conhecimento.

À minha quase IC, Mari, sempre muito solícita. Pela amizade, carinho, apoio, conversas, conselhos, risadas, auxílio nas loucuras HP e, claro, pelos momentos de distração.

Às vizinhas, Lara e Pri, pela amizade, apoio, desabafos, empréstimos de materiais, tardes de mate e risadas. Lara, pela ajuda na fotodegradação.

Ao “Lab Mais Mara” (Rose, Ju B., Ju L., Thami, Jose, Roberta, Watussi, Jéssica, Lu e Maiara) pela amizade, rodas de mate, conversas, conselhos de vida, auxílio e troca de experiência e por ser um ambiente de trabalho maravilhoso. Sem esquecer as queris Ana, Andréia G. e Sara, pela amizade, risadas, trocas de conhecimentos e carinho.

Aos meus amigos, Leandro e Émerson, pela amizade, carinho, conselhos, apoio, risadas e mates dominicais.

À Duda, Dida e Mateus pelo carinho, amizade, conversas, risadas, apoio. Por terem amenizado a pressão e ansiedade na etapa final.

Aos demais amigos que sempre estiveram torcendo e me apoiando.

À Profª. Liliane Bauermann e seus orientados, especialmente a Isabel e Julie, pelo auxílio e realização do trabalho *in vivo*.

À Marina pelo auxílio e realização do estudo histológico.

Aos técnicos administrativos pelo trabalho prestado.

À Capes, órgão financiador de bolsas de estudos.

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas e auxílios despendidos.

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

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

EMPREGO DO ÓLEO DE *Borago officinalis* L. NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO TÓPICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE

AUTORA: JULIA WEBER SCHIAVO

ORIENTADORA: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de abril de 2014.

Esse trabalho buscou obter formulações semissólidas e nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona, visando sua aplicação no tratamento da dermatite atópica. Uma formulação semissólida do tipo creme-gel contendo o óleo de borragem foi preparada e apresentou resultados satisfatórios para os testes empregados (pH, espalhabilidade e viscosidade adequadas para aplicação tópica). O ensaio *in vivo* realizado em ratos Wistar evidenciou a ação anti-inflamatória tópica do óleo. Adicionalmente, suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, contendo o óleo de borragem e dipropionato de betametasona, as quais foram caracterizadas em relação ao tamanho médio de partículas, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, microscopia de transmissão eletrônica, pH, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento. As formulações apresentaram pH levemente ácido (6,0-6,2), partículas de tamanho nanométrico (180-210 nm), baixo índice de polidispersão (< 0,1), potencial zeta negativo (-9 a -16 mV), teor de betametasona próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100%. No período de 15 dias de armazenamento, a temperatura ambiente, apenas o potencial zeta. O estudo de fotodegradação do dipropionato de betametasona frente à luz UVC foi realizado e evidenciou a relevância dos sistemas nanoestruturados na proteção do fármaco. O estudo de liberação *in vitro* a partir das suspensões demonstrou a capacidade das nanocápsulas em reduzir a liberação do fármaco. As nanoestruturas foram incorporadas em hidrogéis (Carbopol[®] Ultrez e Cellosize[®]), os quais foram avaliados quanto ao pH, tamanho de partículas, espalhabilidade, propriedades reológicas e teor de fármaco. Os hidrogéis apresentaram pH ácido, tamanho de partícula nanométrico, teor de betametasona próximo ao teórico (0,5 mg/g) e comportamento pseudoplástico (modelo Herschel-Bulkley). No estudo de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir dos hidrogéis verificou-se uma liberação menor do fármaco nos diferentes tempos de análise em comparação com os hidrogéis contendo o fármaco não associado. O ensaio *in vivo* para avaliar a atividade anti-inflamatória dos hidrogéis contendo as nanoestruturas foi também realizado, sendo possível comprovar a atividade do fármaco e do óleo quando associados à nanocápsulas poliméricas.

Palavras-chave: dipropionato de betametasona; formulações semissólidas; óleo de borragem; nanocápsulas.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

EMPLOYMENT OF *Borago officinalis* L. OIL IN THE DEVELOPMENT OF FORMULATIONS SEMISOLIDS AND NANOCAPSULES POLYMER INTENDED FOR TOPICAL TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES OF THE SKIN

AUTHOR: JULIA WEBER SCHIAVO

ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Place and Date of Defense: Santa Maria, April 28, 2014.

This study aimed to obtain semisolids formulations and lipid core nanocapsules containing borage oil associated or not with betamethasone dipropionate, for their application in the treatment of atopic dermatitis. A gel-cream containing borage oil was prepared and presented satisfactory results for performed tests (pH, spreadability and viscosity suitable for topical application). The *in vivo* assay showed topical anti-inflammatory action of the oil in rats. Additionally, nanocapsule suspensions containing borage oil and betamethasone dipropionate were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method and were characterized. The colloidal suspensions, showed a slightly acid pH (6.0-6.2), nanosized particles (180-210 nm), with a low polydispersity index (<0.1), negative zeta potential (-9 to -16 mV), betamethasone content was close to theoretical and encapsulation efficiency of approximately 100%. After 15 days of storage at room temperature, only zeta potential. Photodegradation study of betamethasone dipropionate using UVC light was performed. It was observed a protection against photodegradation conferred by the nanostructured drug delivery systems. The *in vitro* release study of betamethasone dipropionate from nanocapsule suspensions demonstrated the ability of nanostructures to decrease the drug release. These nanostructures were incorporated into hydrogels (Carbopol® Ultrez and Cellosize®). The hydrogels were evaluated and showed acidic pH, nanosized particle, betamethasone content near to theoretical (0.5 mg / g) and pseudoplastic behavior (Herschel-Bulkley model). *In vitro* release study of betamethasone dipropionate from the hydrogels demonstrated a reduced release of the drug in the different analysis times, as compared with hydrogels containing the non-associated drug. The *in vivo* anti-inflammatory assay showed the anti-inflammatory activity of the hydrogels containing the nanostructures, which can demonstrate the drug and the oil activity when combined with polymeric nanocapsules.

Keywords: betamethasone dipropionate; borage oil; semisolids formulations; nanocapsules.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Estrutura química do dipropionato de betametasona 29

CAPITULO 1: DEVELOPMENT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEL-CREAM CONTAINING BORAGE OIL

FIGURE 1. Graphical representation of spreadability (E_i) *versus* weight (g) for the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) after preparation..... 39

FIGURE 2. Rheograms of the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}). (A) After preparation; (B) After 30 days at 25 °C..... 49

CAPITULO 2: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LÍPIDICO CONTENDO ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

FIGURA 1. Peso dos filmes poliméricos ($n = 3$)..... 56

FIGURA 2. Distribuição do tamanho de partículas das nanocápsulas, analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) NC_{OB-DB} ; (B) NC_{OB} 57

FIGURA 3. Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas poliméricas, analisadas por mobilidade eletroforética. (A) NC_{OB-DB} ; (B) NC_{OB} 57

FIGURA 4. Imagens por MET das nanocápsulas poliméricas. (A) NC_{OB-DB} (150,000 x; bar = 200 nm); (B) NC_{OB} (150,000 x; bar = 200 nm)..... 58

FIGURA 5. Representação gráfica do tamanho médio das partículas e do índice de polidispersão (PdI) das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de borragem (NC_{OB}) e dipropionato de betametasona (NC_{OB-DB}) determinados no estudo de estabilidade à temperatura ambiente..... 59

FIGURA 6. Representação gráfica do potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de borragem (NC_{OB}) e dipropionato de betametasona (NC_{OB-DB}) determinados no estudo de estabilidade à temperatura ambiente..... 59

FIGURA 7. Teor residual de betametasona em função do tempo após exposição da solução do fármaco em acetonitrila (S-DB) e nanocápsulas poliméricas (NC_{OB-DB}) à luz UVC..... 61

FIGURA 8. Perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir da

suspensão de nanocápsulas (NC _{OB} -DB) e solução em acetonitrila (S-DB).....	62
FIGURA 9. Reogramas dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC _{OB} -DB e G2-NC _{OB} -DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC _{OB} e G2-NC _{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) (n = 3, média ± s).....	66
FIGURA 10. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do dipropionato de betametasona a partir dos hidrogéis em função do tempo (h).....	68

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1: DEVELOPMENT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEL-CREAM CONTAINING BORAGE OIL

Table 1. Qualitative and quantitative composition of the gel-cream containing borage oil (GC _{BO}) and gel-cream base (GC).....	36
Table 2. pH values of the semisolid formulations (n = 3, mean ± SD).....	38
Table 3. Values of viscosity (η) and yield (τ_0) of the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC _{BO}) after preparation and 30 days of storage at 25 °C (n = 3; mean ± SD).....	41
Table 4. Anti-inflammatory activity of the gel-cream containing the borage oil (GC _{BO}) and gel-cream base (GC) (n = 6; mean ± SD).....	41

CAPITULO 2: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LÍPIDICO CONTENDO ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas.....	49
Tabela 2. Composição quali-quantitativa dos hidrogéis preparados com Carbopol [®] Ultrez 10NF.....	52
Tabela 3. Composição quali-quantitativa dos hidrogéis preparados com Cellosize [®] QP-100.....	53
Tabela 4. Valores de pH obtidos para as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem (NC _{OB}) e dipropionato de betametasona (NC _{OB} -DB) após preparação (tempo zero) e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (n = 3, média ± s).....	60
Tabela 5. Resultados obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC _{OB} -DB e G2-NC _{OB} -DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC _{OB} e G2-NC _{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) (n = 3, média ± s).....	64
Tabela 6. Valores de índice de fluxo (n), índice de consistência (k) e tensão de cisalhamento limite (τ_0) para os hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC _{OB} -DB e G2-NC _{OB} -DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC _{OB} e G2-NC _{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) (n = 3, média ± s).....	67

Tabela 7. Peso médio dos *pellets* antes e após a indução da inflamação para os animais tratados com os hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC_{OB} e G2-NC_{OB}), hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) e hidrogel base (G1 e G2) (n = 6, média ± s)..... 69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo Geral	18
1.2 Objetivos Específicos	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 Dermatite Atópica	20
1.2 Nanopartículas	22
1.3 Óleo de semente de <i>Borrago Officinalis L.</i>	27
1.4 Dipropionato de Betametasona	29
CAPITULO 1: DEVELOPMENT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEL-CREAM CONTAINING BORRAGE OIL	32
CAPITULO 2: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LÍPIDICO CONTENDO ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA	44
1.1 Apresentação	44
DISCUSSÃO GERAL	76
CONCLUSÃO	85
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	87

INTRODUÇÃO

A pele atua como um sistema primário de defesa do organismo, caracterizada por uma barreira epidérmica que age monitorando a sua permeabilidade (SANTOS et al., 2010). É composta por diferentes camadas: a epiderme, constituída por tecido epitelial de revestimento e apresenta como principal função a proteção e o equilíbrio hidroeletrolítico; a derme se caracteriza pela presença de tecido conjuntivo e possui funções de termorregulação, percepção e proteção (DANGELO, 2005; RIBEIRO, 2010). Um terceiro componente, o tecido subcutâneo (hipoderme) também faz parte da constituição da pele e funciona como barreira mecânica e térmica, que sintetiza e estoca substâncias energéticas (BARRY, 2005).

A dermatite atópica é uma doença da pele, caracterizada por prurido intenso e inflamação cutânea. Sua incidência em crianças com idade inferior a sete anos aumentou muito nos últimos anos, com uma taxa de prevalência entre 10 a 12%. O desenvolvimento da doença está associado a fatores genéticos, defeitos de barreira da pele e desregulação imune, além de fatores ambientais, tais como alérgenos, substâncias irritantes, condições climáticas e geográficas, estrutura corporal, estresse psicológico, infecções secundárias, entre outros (LEUNG, 2004; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010).

O tratamento da dermatite atópica exige cuidado com a pele, identificação e eliminação dos fatores de exacerbação e o uso de fármacos com propriedades anti-inflamatórias. Para a prevenção deve-se evitar o contato da pele com lã, materiais sintéticos e alimentos que induzam irritação. Dentre as formulações, os cremes contendo antiflogísticos, corticosteroides, inibidores de calcineurina, alcatrão, capsaicina e antibióticos locais são os mais empregados (LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010).

Entre os diversos corticoesteróides utilizados tem-se a betametasona e seus derivados. O dipropionato de betametasona é um éster derivado da betametasona, o qual é utilizado no tratamento de doenças de pele devido apresentar ação antiproliferativa, anti-inflamatória e antipruriginosa (BOGUNIEWICZ, 2004; CASTRO et al., 2006; AZULAY, 2008). Entretanto pode causar efeitos adversos a curto e/ou longo prazo, além de durante sua síntese ou exposição a diferentes meios produzir impurezas (SHOU, 2009).

A fim de minimizar os efeitos adversos das substâncias ativas e para agregar as propriedades os óleos de origem vegetal vêm sendo utilizados, em preparações farmacêuticas e cosméticas, por apresentarem propriedades emolientes, hidratantes, lubrificantes e, em alguns casos, conferem efeitos terapêuticos devido à presença de substâncias ativas. Além disso, podem ser utilizados como excipientes em cosméticos e medicamentos, substituindo ou

reduzindo o uso de compostos sintéticos na formulação (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000; RIBEIRO; ESQUÍVEL; BERNARDO GIL, 2007). Óleos ricos em ácido γ -linolênico (ω -6) são capazes de auxiliar na função da barreira cutânea e influenciar na resposta inflamatória, como o óleo de prímula, óleo de groselha negra e óleo de borragem (BROSCHÉ; PLATT, 2000; FOSTER et al., 2010).

O óleo de borragem, obtido da semente do *Borrago Officinalis L.*, tem se destacado por suas propriedades emoliente, diurética e anti-inflamatória. Além de ácido γ -linolênico, é composto por tocoferóis, compostos fenólicos e mais de 60% de ácidos graxos poli-insaturados. Comercialmente, é encontrado na forma de cápsulas oleosas e cremes (SOTO; CONCHA; ZUNIGA, 2008).

Na busca de alternativas terapêuticas no desenvolvimento de sistemas coloidais tem-se utilizado óleos vegetais para aplicação tópica, conforme demonstrado por alguns autores (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000; FRIEDRICH et al, 2008; ALMEIDA et al, 2009). Dentre as vantagens dos nanocarreadores pode-se citar a possibilidade de aprimorar a liberação de substâncias ativas em locais específicos, agindo como um sistema carreador de fármaco. O seu uso em formulações tópicas garante proteção da área afetada frente à toxicidade do ativo, prevenindo ou reduzindo possíveis reações de sensibilidade. Isso ocorre devido à diminuição do contato direto do fármaco com a região alvo, além do uso de concentrações menores (POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A partir do exposto, o presente trabalho foi delineado no sentido de estudar a viabilidade tecnológica de empregar o óleo de borragem como matéria-prima lipídica para a preparação de formulações semissólidas e nanocápsulas poliméricas. Cabe salientar que, até o momento, não há relatos na literatura sobre o desenvolvimento de formulações semissólidas do tipo creme-gel e hidrogel, bem como nanocápsulas contendo o óleo em estudo abordando aspectos relacionados à caracterização físico-química, estabilidade e atividade anti-inflamatória.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade tecnológica de produção de formulações semissólidas contendo o óleo de borragem e sua associação com dipropionato de betametasona em nanocápsulas, visando sua aplicação no tratamento da dermatite atópica.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar uma formulação semissólida, do tipo creme-gel, contendo o óleo de borragem e avaliar as suas características físico-químicas no que se refere ao pH, centrifugação, espalhabilidade, viscosidade e características reológicas. E avaliar a estabilidade do creme-gel frente ao diferentes condições de armazenamento;
- Preparar nanocápsulas contendo como núcleo oleoso o óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona. E avaliar as características físico-químicas e a estabilidade das nanoestruturas quanto ao teor e eficiência de encapsulamento; diâmetro médio de partículas, polidispersão, potencial zeta e pH;
- Avaliar a fotoestabilidade do dipropionato de betametasona associado às nanocápsulas e comparar com uma solução do fármaco (não associado);
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir da suspensão de nanocápsulas, utilizando o método de saco de diálise;
- Preparar e caracterizar formulações semissólidas do tipo hidrogéis contendo as nanocápsulas. Comparar os perfis de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis, utilizando células de difusão do tipo Franz;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das formulações semissólidas desenvolvidas (convencional e de base nanotecnológica) utilizando o modelo de indução de tecido granulomatoso.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Dermatite Atópica

A pele é uma interface entre o corpo e o meio externo e representa mais de 15% do peso corpóreo. É um órgão que reveste o organismo e protege os tecidos contra traumas, desidratação e invasão de microrganismos externos; apresenta terminações nervosas sensitivas e é muito importante na regulação da temperatura corporal, excreção e absorção de substâncias. A composição da pele é essencialmente de: camada epitelial superficial – epiderme, que possui diversos anexos (unhas, folículos pilossebáceos e glândulas); camada vascularizada de tecido conjuntivo – derme; e a camada de tecido celular subcutâneo – hipoderme. O estrato córneo, constituinte da barreira epidérmica, pode sofrer alterações devido um fator fisiopatológico primário de algumas doenças (SAMPAIO, RIVITI, 2008; OLIVEIRA, SANTOS, GUEDES, 2010; SANTOS et al., 2010).

Alterações patológicas na pele podem ocorrer, causando lesões, sendo essas basicamente: degeneração, alteração metabólica, proliferação, malformação, disfunção e inflamação. Esses processos podem ocorrer isolada ou combinadamente, ocasionando doenças cutâneas como psoríase e dermatoses (OLIVEIRA, SANTOS, GUEDES, 2010). As dermatites são caracterizadas por edema, eritema, infiltração, vesiculação, secreção, formação de crostas, escamas, além de prurido mínimo, moderado ou intenso. Dependendo do aspecto apresentado, as dermatites podem ser classificadas em aguda, subaguda ou crônica (SAMPAIO, RIVITI, 2008).

A dermatite atópica (DA) é uma forma crônica inflamatória de doença de pele, que apresenta prurido intenso e lesões eczematosas e frequentemente se manifesta agregada à asma e/ou rinite e, casualmente, urticária (SAMPAIO, RIVITI, 2008; LIPOZENIC, LJUBOJEVIC, 2010). Em 1925, Cocca definiu-a como uma tendência hereditária para desenvolver alergia a antígenos alimentares ou inalantes (AZULAY, 2008). Sabe-se que muitos fatores influenciam na patogênese da DA, como fatores genéticos, mecanismo imunológico e não-imunológico (SAMPAIO, RIVITI, 2008).

A atopia é causada por defeitos em múltiplos genes, sendo que 30 genes já foram identificados (SAMPAIO, RIVITI, 2008). Autores ainda divergem quanto à herança ser autossômica dominante ou recessiva, mas afirmam a importância dos fatores genéticos na determinação da atopia, juntamente com os fatores ambientais. Sendo estes últimos

exemplificados por alérgenos, irritantes, condições climáticas e geográficas, estrutura corporal, estresse psicológico, infecções secundárias entre outros.

A imunodeficiência (IgA e IgM seletivas) está frequentemente associada a DA. Outra característica muito importante é a elevada produção de IgE. O aumento dessa imunoglobulina pode estar relacionado com a gravidade da doença e com determinadas patologias, como asma e rinite alérgica. A DA é, também, uma consequência da resposta imune tipo IV e, frequentemente, aparecem linfócitos T CD4+ infiltrados na pele (AZULAY, 2008; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010). Para esses linfócitos foi verificada a presença de resposta proliferativa auto-imune frente às células epidérmicas lesadas e manifestam citotoxicidade elevada frente a fibroblastos.

Alterações no metabolismo de ácidos graxos, como a diminuição dos níveis de ácido γ -linolênico e ácido digama-linolênico ocorrem em pacientes com DA, sendo ácidos importantes para a fisiologia e a estrutura da pele (LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010). Além disso, tais metabólitos formam produtos de grande potencial para a modulação inflamatória, imunológica e respostas proliferativas. A deficiência de ácidos graxos essenciais faz com que a pele fique inflamada, escamosa, com uma maior proliferação de células epidérmicas, atividade metabólica e formação de ésteres de esterol e queratinócitos anormais, além de afetar a perda de água transdérmica (WRIGHT, 1991; HORROBIN, 2000; ZIBOH et al, 2000).

Alguns estudos mostram que a prevalência da dermatite atópica está ligada a idade de início dos sintomas, sendo dependente da localização geográfica, condições climáticas, nível socioeconômico e poluição. Segundo o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) as maiores taxas de prevalência foram encontradas nos centros urbanos da África, Austrália, norte e oeste da Europa; taxas intermediárias na América Latina e Ásia Oriental e taxas menores na China, leste Europeu e Ásia Central, sendo que em todas as regiões as crianças são as mais acometidas pela doença. No Brasil, de acordo com o ISAAC, sua prevalência é de 10 a 15% da população (CASTRO, 2006; AZULAY, 2008).

A DA manifesta-se em três estágios: lactente, infância e adulto. Cada fase evidencia reações cutâneas agudas, subagudas e/ou crônicas, sendo que os três estágios podem estar presentes no mesmo paciente. Os problemas de pele iniciam a partir do segundo mês de vida (fase lactente), normalmente, nesta fase as lesões constituem-se de placas eritematosas descamativas simétricas secas, com pápulas foliculares sobre a face. Em 90% dos pacientes o início da doença dá-se antes do cinco anos (fase infância), tendo nesse estágio um quadro clínico modificado com pápulas e placas localizadas nas flexuras de grandes articulações, em

particular no pescoço, cotovelos, punhos, joelhos e tornozelos. A doença pode desaparecer por completo nessa fase, mas havendo recidivas ou outras doenças atópicas, devido à função de barreira cutânea nunca se recuperar por completo. Já na fase adulta, observa-se liquenificação, evolução crônica e áreas espessadas nas flexuras, pescoço e nas pálpebras, com edema facial crônico. A DA tem evolução crônica ou crônica-recidivante, com regressões e exarcebações das alterações de pele, com prurido variável (SAMPAIO, RIVITI, 2008; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010).

Para diagnosticar a dermatite utiliza-se da clínica, através da anamnese, morfotopografia das lesões, presença de prurido, cronicidade e pode ser expressa, ocasionalmente, quando associada a doenças atópicas respiratórias, aumento de IgE. Para diagnose diferencial consideram-se outras dermatites eczematosas, psoríase, dermafíteses, pitiriíase rósea, síndrome de hiper-IgE e outras, as quais se manifestam de forma parecida à dermatite atópica.

O tratamento tópico da dermatite atópica é dificultado em lesões extensas, as quais necessitam de maior tempo de aplicação e, assim, a adesão ao tratamento pode ocorrer de forma inadequada (OCHAITA; FERNANDÉZ, 2001). Sendo assim, diversas terapias são indicadas: emolientes, antibióticos, imunomoduladores, macrolídeos, ciclosporina, antihistamínicos, corticoterapia, e até mesmo fototerapia. Os corticoesteróides são os fármacos mais utilizados, destacando-se: dipropionato de betametasona, fuorato de mometasona, desonida, dexametasona, hidrocortisona e dipropionato de clobetasol. (BOGUNIEWICZ, 2004; BOS; SPULS, 2008; AZULAY, 2008; CARRASCOSA et al., 2009; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010). Devido aos seus efeitos adversos (atrofia cutânea, erupções, exacerbação de vírus ou bactérias), é comum a utilização de terapias alternativas e/ou sinérgicas como o uso de óleos vegetais, em virtude de suas propriedades emolientes e hidratantes (BARZEGAR; PRADALIER, 2002; CASTRO et al, 2006; FOSTER et al, 2010).

1.2 Nanopartículas

Na área farmacêutica alguns obstáculos são encontrados na administração e absorção cutânea de fármacos e devem ser considerados, tais como: peso molecular e lipofilicidade da substância, tipo de formulação, o aspecto do estrato córneo e o grau de hidratação, as propriedades físico-químicas dos veículos e substâncias ativas, além da interação fármaco-membrana e suas propriedades farmacotécnicas (KALIA; GUY, 2001; VERMA et al., 2003; PARDEIKE et al., 2009). Para isso ser revertido ou amenizado alguns parâmetros podem ser

alterados (coeficiente de partição, difusão e solubilidade), a fim de aumentar a absorção de substâncias (KALIA; GUY, 2001).

Nesse sentido, muitos estudos vêm sendo realizados e uma área que tem sido foco é a nanotecnologia. Essa apresenta uma importante aplicabilidade na administração de fármacos e ativos cosméticos, tendo como intenção aumentar a penetração de fármacos (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Os sistemas nanoestruturados desempenham controle na liberação de fármacos de forma precisa, reprodutível e segura, bem como alteram a solubilidade da substância; melhoram a farmacocinética e a biodistribuição de agentes terapêuticos; vetorizam e acumulam o princípio ativo no local de ação, minimizando sua toxicidade e ocorrência de efeitos colaterais (SCHAFFAZICK et al., 2003; HUYNH et al., 2009; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). E, ainda, o tamanho reduzido destes sistemas facilita a incorporação em produtos dermatológicos, propiciando uma melhora nas características sensoriais quando aplicados na pele (PERUGINI et al., 2002).

Os nanocarreadores de maior relevância farmacêutica são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas coloidais, classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, diferindo na estrutura e composição. As nanocápsulas apresentam uma estrutura vesicular e são compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, e o fármaco pode estar disperso ou dissolvido no núcleo, e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são estruturas matriciais poliméricas, não possuindo óleo em sua composição, podendo o fármaco ficar retido e/ou adsorvido à matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER, 2009). Atualmente, em virtude de modificações na composição, foram desenvolvidas nanocápsulas com um núcleo contendo substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano), sendo essas designadas por nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas apresentam como vantagens a possibilidade de melhorar e aumentar a distribuição da substância no local de ação, e direcionar ao seu sítio específico, além de aumentar sua meia-vida e a estabilidade do fármaco frente à luz, oxidação, hidrólise e alterações de pH (SAHOO et al, 2007; OURIQUE et al., 2008; WEISS-ANGELI et al., 2008; FONTANA et al.,2010; FLORES et al., 2011).

Cabe salientar que a escolha do polímero deve levar em consideração a via de administração a ser utilizada, a capacidade de encapsulamento, suas características

biodegradáveis e biocompatíveis, o pH do meio e o tamanho de partícula; e ainda depende do método de preparação e da aplicação (CAUCHETIER et al., 2003; ANTON et al., 2008; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; ESMAEILI et al., 2011). Sendo os polímeros mais utilizados densos, rígidos e biodegradáveis, entre os quais se destacam os polímeros do ácido lático (PLA), ácido lático-co-glicólico (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), e poli(acrilato) e poli(metacrilato) (Eudragits); polímeros de origem natural (quitosana, alginato, gelatina e albumina); e co-polímeros: poli(lático)-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG), poli(lático-co-glicólico)-poli(etileno glicol) (PLGA-PEG) (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

A parede polimérica tem a capacidade de proteger a substância ativa da fotodegradação, o que foi observado em alguns trabalhos com benzofenona-3 (ALMEIDA et al., 2009), rutina (ALMEIDA et al., 2010) tretinoína (OURIQUE et al., 2011), ditranol (SAVIAN, 2012) e tioconazol (HARTER, 2013), por exemplo. Também confere proteção frente à volatilização (FLORES et al., 2011) e capacidade em controlar a liberação da substância ativa (CONTRI et al., 2011; FONTANA et al., 2011; HARTEER, 2013).

A incorporação de substâncias ativas em nanocápsulas poliméricas está relacionada, entre outras, a lipofilia do fármaco e sua afinidade com o núcleo oleoso. Neste sentido, a utilização de diferentes óleos vegetais no desenvolvimento destes sistemas tem despertado atenção dos pesquisadores, devido ao interesse sinérgico de suas atividades terapêuticas, agregado ao papel de núcleo oleoso (ZULFAKAR et al., 2010; RIGO et al., 2011). Além disso, as diferentes características apresentadas pelos óleos podem influenciar nas propriedades dos nanocarreadores. Dentre elas, verificou-se que a viscosidade do óleo tem relação com o tamanho de partícula, como demonstrado em um estudo realizado com os óleos de oliva, soja e linhaça. O óleo de linhaça, muito menos viscoso e com menor tensão interfacial comparado ao óleo de oliva, formou partículas com diâmetro significativamente menor (FREITAS, 2006). Esmaeili e colaboradores (2011) verificaram que o aumento da quantidade de óleo utilizada no desenvolvimento de nanocápsulas levou a um maior tamanho de partícula, tendo em vista o aumento da viscosidade da fase orgânica. No entanto, alguns autores afirmam que não há uma relação direta entre a viscosidade e o tamanho de partícula, pois outros fatores podem afetar o diâmetro médio das nanocápsulas poliméricas (BOUCHEMAL et al., 2004).

Outra característica importante se refere à proporção de polímero:óleo utilizada na preparação das nanocápsulas e sua influência no tamanho de partícula. Khoe e Hossainzadeh (2010) verificaram que diminuindo a razão polímero/óleo é possível obter nanocápsulas com

maior tamanho de partícula e com uma maior quantidade de fármaco encapsulada. Resultados semelhantes foram obtidos por Yu e colaboradores (1993) na preparação de nanocápsulas contendo extrato de camomila quando uma maior quantidade de óleo foi utilizada. O encapsulamento do óleo de peixe foi realizado por Choi e colaboradores (2009) a fim de minimizar o seu odor e a suscetibilidade a oxidação. Os resultados obtidos demonstraram que a quantidade de óleo e polímero (PCL ou β -ciclodextrina) influenciou no tamanho médio das partículas obtidas.

Uma das vantagens associada ao desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleos vegetais reside na possibilidade destes sistemas em estabilizar seus componentes e/ou substâncias ativas. Nanopartículas contendo como núcleo oleoso os óleos de semente de uva e amêndoas e benzofenona-3 como substâncias modelo foram preparadas, e os resultados demonstraram que a presença do filtro solar não influenciou na estabilidade do sistema nanoestruturado. Além disso, o alto teor de ácidos graxos presente nos óleos, especialmente do óleo de semente de uva, influenciou no pH e no potencial zeta da formulação após seis meses de estudo, tendo em vista a maior presença de ácidos graxos livres na superfície das partículas (ALMEIDA et al., 2009). Rigo e colaboradores (2011) desenvolveram nanocápsulas contendo diferentes óleos vegetais (arroz, soja e girassol) e observaram que as formulações permaneceram estáveis pelo período de três meses de estocagem e não apresentaram potencial genotóxico. Gupta e Ghosh (2012) demonstraram que a utilização de um antioxidante na preparação de nanocápsulas de alginato, contendo como núcleo oleoso o óleo de palma, foi significativamente importante para obter formulações mais estáveis.

Dentre as vias de administração direcionadas ao desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas se destacam as vias parenteral, oral, oftálmica e tópica (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Mais recentemente, a via pulmonar tem despertado interesse em algumas pesquisas (BECK-BROICHSITTER et al., 2009; DEVADASU et al., 2012, SINHA et al., 2012;).

A aplicação tópica destes nanocarreadores é desafiante na área farmacêutica, e a passagem do fármaco pelo estrato córneo caracteriza uma das etapas importantes a ser investigada. Desta forma, as nanopartículas obtidas por polímeros biodegradáveis surgem com o propósito de romper essa barreira e promover uma liberação sustentada/prolongada do ativo, além de diminuir a irritação local provocada pelo fármaco e evitar a absorção sistêmica através da pele, características principais de sua utilização (GUTERRES, 1995; MARCHIORI et al., 2010; NEMEM; LEMOS-SENA, 2011). O polímero poli(ϵ -caprolactona) é o mais

utilizado para aplicação tópica, por ser biodegradável, biocompatível e por suas propriedades mecânicas (KIM; RHEE, 2003). Além disso, apresentam um excelente potencial de modificação de superfície via transformações químicas e mostrando-se apropriado para o aprisionamento e a liberação de uma ampla gama de agentes terapêuticos (FARAJI; WIPF, 2009).

A utilização das nanocápsulas poliméricas propiciam uma maior distribuição e eficácia para administração tópica (ALVES et al., 2007; PAESE et al., 2009). Além de vantagens como a modulação da absorção transdérmica, a capacidade de adesividade do produto e a liberação homogênea devido a grande área superficial dos sistemas nanométricos. Ainda, para formulações de uso tópico, essas proporcionam proteção à área exposta frente à toxicidade, o que se deve ao fato de haver um menor contato do fármaco com a região afetada (BOUCHEMAL et al., 2004; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; WEISS-ANGELI et al., 2008).

A incorporação desses nanocarreadores em bases semissólidas (géis ou emulsões) demonstra outros benefícios relacionados à aplicação na pele, os quais podem se acumular no folículo piloso, alcançando as estruturas funcionais mais profundas, onde serão armazenados por alguns dias e promover um efeito reservatório. O que os diferencia das formulações convencionais, sendo estas de fácil remoção pelo umedecimento, fricção ou qualquer tipo de contato do paciente (LADERMANN et al., 2007).

As formulações semissólidas quando têm incorporadas a si esses sistemas, promovem uma maior estabilidade a eles, devido os carreadores nanoestruturados serem fisico-quimicamente limitados em sistema aquoso. Também modificam as propriedades reológicas, controlando a viscosidade, o que influencia na espalhabilidade do produto sob a pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Além disso, auxiliam na diminuição do eritema, proporcionam maior contato do ativo com o estrato córneo, formam um filme protetor na superfície da pele (ALVAREZ-ROMAN et al., 2001); e, ainda, promovem maior conforto ao paciente pela redução da quantidade de administrações (JIMENEZ et al., 2004).

Estudos a cerca do desenvolvimento de hidrogéis contendo nanocarreadores são descritos na literatura e tem demonstrado resultados satisfatórios quando comparados com a formulação contendo a substância não associada ao nanossistema. Dentre os polímeros utilizados como formadores de gel têm-se: Carbopol[®] 940 (MILÃO et al., 2003; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; ALVES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010); Pluronic[®] F127 (MIAZAKI et al., 2005); Natrosol[®] 250M (LUENGO et al., 2006); Carbopol[®] Ultrez 10 NF (MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011; FONTANA et al., 2011);

Hidroxipropilmetilcelulose (BATHEJA et al., 2011); Carbopol[®] 981 NF (SHAH et al., 2012) e Aristoflex[®] AVC (SAVIAN, 2012; HÄRTER, 2013).

1.3 Óleo de semente de *Borrago Officinalis L.*

A indústria farmacêutica tem cada vez mais desfrutado de matérias-primas de origem vegetal de forma isolada ou combinada, devido suas características como adjuvantes farmacotécnicos e propriedades farmacológicas (NASCIMENTO et al., 2007; HOW; RASEDEE; ABBASALIPOURKABIR, 2013). Na busca de terapias alternativas para o tratamento de doenças cutâneas os produtos de origem vegetal denotam das mais variadas propriedades terapêuticas, proporcionando grandes vantagens para utilização na medicina convencional (BUCK et al., 1994; SYED et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2007). Dentre essas matérias-primas têm-se os óleos vegetais, que por suas propriedades farmacológicas comprovadas já estão incorporados em códigos oficiais, como a Farmacopéia Européia e a Farmacopéia Britânica (VEIGA JR.; PINTO, 2002; BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos vegetais são obtidos de sementes, amêndoas e frutos de diversas plantas, e sua composição é rica em substâncias lipídicas. Sendo essas frações lipídicas ricas em ácidos graxos essenciais, exercem papel importante no funcionamento e na manutenção do organismo. Outras características apresentadas pelos óleos vegetais incluem atividade antioxidante, funções vitamínicas, propriedades de emoliência e hidratação (ISAMIL et al., 2004; SIGER et al., 2007).

O *Borrago officinalis L.* é uma planta herbácea anual pertencente à família das Boragináceas, nativa da região do Mediterrâneo, também cultivado no Canadá (ROEDER et al., 2001; HAFID, 2002). É conhecida por sua ação antiespasmódica, antihipertensiva, antipirética, afrodisíaca, diurética, emoliente, além ser utilizada no tratamento de asma, bronquite, cólicas, diarreia, palpitações e doenças renais (GILANI, 2007).

O cultivo da planta dá-se pela importância nutricional e medicinal, sendo a produção de suas sementes destinada para a extração do óleo. O óleo de borragem (OB) é rico em ácidos graxos insaturados, dentre eles o mais abundante é o ácido γ -linolênico (cerca de 30%). Além deste, apresenta em sua composição taninos, ácido ascórbico, betacaroteno, flavonóides, alcaloides pirrolizidínicos e 60% de ácidos poli-insaturados (LU, 1995; LANGER, 1997; CUNHA, 2004).

Os alcalóides pirrolizidínicos são responsáveis pela hepatotoxicidade e atividade carcinogênica do óleo, sendo necessária cautela no seu uso excessivo ou prolongado

(LANGER, 1997; HERRMANN et al., 2002; CONFORTI et al., 2008). Além disso, o alto percentual de ácidos poli-insaturados é a principal causa da baixa estabilidade do óleo, os quais são suscetíveis à oxidação. Entretanto, apesar de apresentar em sua composição tocoferóis e outros componentes fenólicos, os quais são responsáveis em preservar a qualidade das sementes, o processo de extração e as condições de armazenamento podem afetar a quantidade de compostos antioxidantes e, com isso, a estabilidade do óleo. A presença de clorofila endógena, um componente secundário, influencia na foto-oxidação (SENSIDONI et al., 1995; KHAN; SHAHIDI, 2002; LU, 2003; SOTO et al., 2008).

Por apresentar uma composição rica em ácido γ -linolênico (ω -6), o OB passou ser de interesse clínico no tratamento de doenças como psoríase, dermatite atópica, doenças cardíacas e diabetes. A conversão do ácido γ -linolênico, *in vivo*, ocorre a partir do ácido linolênico, pela ação catalítica da enzima Δ 6-desaturase, que forma o ácido dihomo-gama-linolênio e o ácido araquidônico. Porém, essa biossíntese não ocorre de forma natural na pele humana devido há carência de enzimas desaturases. O déficit desse metabólito pode causar alterações cardiovasculares, hidratação da pele, agregação plaquetária e hepática (ENGLER; ENGLER, 1998; BROSCHE; PLATT, 2000). Esse é o ácido graxo essencial de maior importância no OB e, ainda, pode ser encontrado em óleos vegetais como groselha negra (*Ribes nigrum*), framboesa e prímula (*Oenothera biennis L.*). Em comparação a esses óleos, seu teor no OB é mais elevado, apesar de alguns autores relatarem uma menor eficácia. Além disso, a potência biológica se mostra diferenciada entre os óleos e não há relação direta com a concentração de ácido γ -linolênico presente (ENGLER, 1993; BARRE, 2001).

Apesar de causar divergências quanto à eficácia para dermatite atópica, a suplementação dietética de ácido γ -linolênico, na forma de óleos, vem sendo estudada. A literatura reporta alguns trabalhos com o OB, demonstrando o seu potencial em diminuir sintomas como coceira, exsudação, edema e formação de vesículas (ANDREASSI, 1997; BARRE, 2001; LINNAMAA et al., 2010; FOSTER et al., 2010). Henz e colaboradores (1999) evidenciaram que a administração de 690 mg/dia de óleo é significativamente eficaz no tratamento da dermatite, devido ao aumento de ácido digama-linolênico nos eritrócitos. Em 2000, Brosche e Platt observaram efeitos significativos sob a função de barreira cutânea, após administração oral do OB em idosos. O óleo foi capaz de diminuir a perda de água transdérmica em 10,8% e a coceira, além de aumentar os níveis de ácido γ -linolênico e ácido digama-linolênico na membrana de fosfolipídios dos eritrócitos. Em outro estudo, Conforti e colaboradores (2008) evidenciaram a atividade anti-inflamatória *in vivo* de diversos óleos

vegetais, incluindo o OB, e sugerem que esse efeito deve-se a presença de certos compostos antioxidantes.

Cabe salientar que não há estudos do óleo de borragem incorporado a formulações semissólidas, porém pode ser encontrado a venda na forma de creme e pomada.

1.4 Dipropionato de betametasona

Os corticosteroides tópicos sofrem, até hoje, modificações estruturais para alcançar uma molécula mais estável, de maior afinidade com receptores esteroidais, melhor penetração na pele e moderação dos efeitos secundários. A potência e os efeitos secundários desses fármacos estão relacionados à solubilidade no estrato córneo, e sua absorção cutânea depende do veículo o qual são incorporados. Devido a isso, tais fármacos são classificadas de acordo com a sua potência e o veículo utilizado, que varia da extremamente alta (classe 1) a mais baixa (classe 7). A hidrocortisona, precursora dessa classe farmacológica, está na classe 7; já o dipropionato de betametasona (DB) encontra-se na classe 1 (BOGUNIEWICZ, 2004).

O DB (Figura 1) é um éster derivado da betametasona, a qual sofreu modificações em sua estrutura a fim de melhorar a ação, mimetizar efeitos secundários e proporcionar maior lipofilicidade (AZULAY, 2008). O DB é praticamente insolúvel em água, solubilidade limitada em álcool e solúvel em acetona, clorofórmio e diclorometano, possui massa molecular de 504,6; logP: 3,66; pKa 12,87. Comercialmente, é empregado em preparações semissólidas (pomadas e cremes) e solução injetável, na concentração de 0,64 mg/g (equivalente a 0,5 mg de betametasona).

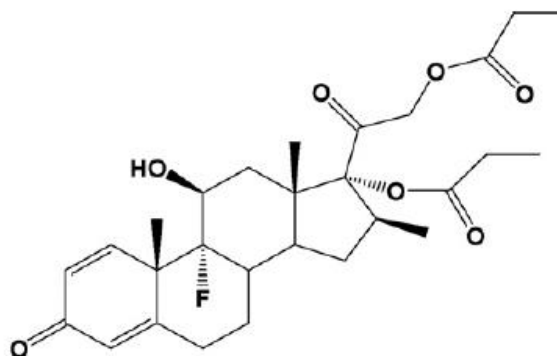


Figura 1. Estrutura química do dipropionato de betametasona.

O fármaco apresenta atividades antiproliferativa, anti-inflamatória e antipruriginosa, sendo muito utilizado para doenças como dermatite atópica e psoríase. As principais reações adversas relatadas para o dipropionato de betametasona compreendem: erupções cutâneas, atrofia da pele, irritação, prurido. O uso prolongado pode desenvolver dermatite alérgica de contato, hipopigmentação e supressão do hipotálamo-hipófise-adrenal (BOGUNIEWICZ, 2004; CASTRO et al., 2006).

Além disso, a presença de impurezas decorrentes do seu processo de síntese ou pela exposição a condições alcalinas ou ácidas pode gerar produtos de degradação, comprometendo a sua utilização (SHOU, 2009). Em 2009, Lin e colaboradores identificaram o isômero dipropionato de lumibetametasona, obtido por fotoindução, a partir de uma solução do fármaco.

Devido às características e efeitos adversos, o DB pode estar associado a outros fármacos (antifúngicos, analgésicos, antibióticos) ou a produtos naturais. A associação do dipropionato de betametasona com o ácido salicílico auxilia na penetração do fármaco na pele (SHOU, 2009). Zulfakar e colaboradores (2010) demonstraram que o óleo de peixe, além de aumentar a distribuição do fármaco na pele, contribuiu para a redução da inflamação, devido à produção de mediadores inflamatórios menos potentes e a inibição de enzimas inflamatórias da pele. Sendo assim, a associação desse óleo é vantajosa por propiciar uma diminuição da dose dos corticoesteróides.

A associação do dipropionato de betametasona a nanocarreadores é relatada na literatura. Em 2009, Ishihara e colaboradores desenvolveram nanopartículas híbridas constituídas de copolímero (PEG-PLA) e ácido graxo com adição de cálcio para obter um melhor encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água, como o dipropionato de betametasona. Os autores verificaram, por degradação enzimática, a boa retenção do fármaco na nanopartícula. Em outro estudo, Gillet e colaboradores (2011) desenvolveram lipossomas com dipropionato de betametasona, de diâmetro médio de partícula na faixa de 140 a 180 nm e os quais proporcionaram uma melhor penetração do fármaco na pele.

**CAPÍTULO 1: DEVELOPMENT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF
GEL-CREAM CONTAINING BORAGE OIL**

DEVELOPMENT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEL-CREAM CONTAINING BORAGE OIL

Julia WEBER¹, Nadine L. FUNK², Isabel ARALDI³, Julie M. NODA³, Marina VENCATO², Liliane F. BAUERMANN¹, Maria Izabel U. M. ROCHA², Cristiane B. SILVA^{1,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900. Santa Maria - RS, Brasil.

³Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900. Santa Maria - RS, Brasil.

Corresponding author: Cristiane de Bona da Silva

Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil
Tel: +55 55 3220-8452 Fax: +55 55 3220-8248

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

SUMMARY

Skin diseases affect hundreds of people around the world and some of these have no effective curative treatment, but only palliative treatment, as atopic dermatitis. The treatment of this skin disorder is mainly performed with antiphlogistic, corticosteroids and antibiotics. As alternative, vegetable oils with anti-inflammatory and emollient activities can be used. So, the aim of this work was to develop a gel-cream containing borage oil as an alternative therapy for treating inflammatory skin disorders. The gel-cream was evaluated in relation to physicochemical characteristics and stability studies, during 30 days, at 25 and 40 °C. Additionally, the *in vivo* anti-inflammatory activity was studied by the induction of granulomatous tissue method. The formulation showed adequate pH value (5.6), spreadability factor of $3.23 \pm 0.19 \text{ mm}^2/\text{g}$, and non-Newtonian behavior, presenting plastic characteristics and thixotropy. In stability evaluation, a small change was observed after the storage period. The *in vivo* assay suggested that the oil could be effective in inhibiting inflammation.

Keywords: anti-inflammatory; atopic dermatitis; borage oil; gel-cream.

INTRODUCTION

The skin is characterized by a barrier that acts monitoring its permeability, and this barrier has as its main constituent of the stratum corneum may be changed due to a primary pathophysiological factor in some diseases, such as atopic dermatitis and psoriasis¹. Atopic dermatitis is a chronic skin disease characterized by intense itching and skin inflammation^{2,3}. It is suggested that one of its etiopathogenesis is due to disorders of essential fatty acids, since it was blocking an enzyme 6-desaturase. This enzyme is responsible for the maintenance of skin integrity and immunomodulatory activity⁴. Seeking alternative therapies not aggressive to the skin, studies using vegetable oils have been made.

Researches on vegetable oils have been widely designed in the pharmaceutical and cosmetic industries since their emollient, moisturizer, lubricant, antioxidant, and vitamin functions characteristics. Furthermore excipients can be used, reducing or replacing the use of synthetic products^{5,6}. The presence of lipid substances rich in essential fatty acids provides important properties of these oils^{7,8}.

The γ -linolenic acid (omega-6) is an essential fatty acid, which is present in various vegetable oils, such as soybean oil, fish oil, evening primrose oil and borage oil^{9,10}. This component attaches the ability for oils to assist in skin barrier function and influences the inflammatory response^{11,12}. It is because the omega-6 is able to form products (dihomogamalinolenic acid and arachidonic acid), which are important mediators of the inflammatory response, are converted to prostaglandins and thromboxanes by cycloxygenases¹¹.

The borage oil, obtained from the seed of *Borago officinalis* L. (native plant of the Mediterranean), has in its composition omega-6 abundantly (30%)^{13,14,15,16}. Hence oil usage in diseases, such as atopic dermatitis, psoriasis, heart disease and diabetes. Furthermore, it is composed of flavonoids, ascorbic acid, betacarotene, pyrrolizidine alkaloids and polyunsaturated fatty (60%), substances responsible for antispasmodic, anti-hypertensive, anti-pyretic, anti-inflammatory, diuretic, emollient oil^{13,14,16,17}.

Though differences in efficacy, studies have shown expressive results in reducing itchiness, exudation, edema and vesicle formation after the use of borage oil^{10,12,18,19}. Significant effects were seen under the skin barrier function and the treatment of atopic dermatitis after oral administration of the oil, resulting in increased digama-linolenic acid and γ -linolenic acid in the phospholipid membranes of erythrocytes^{11,20}. For the purpose in demonstrating anti-inflammatory activity of different vegetable oils, a study carried out Conforti *et al* (2008)²¹ noted the efficacy of borage oil, which was credited to the presence of antioxidants.

Based on this, this paper aims to develop of the semisolid formulation (gel-cream) containing borage oil. The formulation was evaluated in relation to physicochemical characteristics and stability against different storage temperatures. The assay of induction of granulomatous tissue was performed to evaluate the anti-inflammatory activity of oil.

MATERIAL AND METHODS

Material

The borage oil was obtained from the World of Oils (Brasilia, DF, Brazil); non-ionic self-emulsifying (Polawax[®]), Carbopol[®] Ultrez 10NF and imidazolidinyl (Germal[®] 115) were acquired from Delaware (Porto Alegre, RS, Brazil); propyleneglycol was purchased from Proquimios (São Paulo, SP, Brazil). All other chemicals were pharmaceutical grade chemicals and were used as received.

Preparation of semisolid formulations

Gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) and a formulation without the oil (GC – gel-cream base) were prepared, in triplicate. The oil phase (consisting of nonionic self-emulsifying wax and borage oil) and water phase (ultrapure water and propyleneglycol) was mixture, separately. The phases were maintained in heating (70 °C) to dissolve the components, and after reaching a temperature of 40 °C, the Carbopol Ultrez solution was added. After dispersion of the polymer, imidazolidinylurea solution and triethanolamine were added. The quali-quantitative composition of the formulations was described in Table 1. The formulations were prepared in triplicate, placed in double-walled plastic bottles and stored at room temperature (25 ± 2 °C) and climate controlled chamber (temperature 40 ± 2 °C and humidity 75 ± 5 %), over a period of 30 days.

Table 1. Qualitative and quantitative composition of the gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) and gel-cream base (GC)

Components	Amount (%)	
	GC _{BO}	GC
¹ Polawax [®]	5.0	5.0
¹ Borage oil	3.0	-
² Propylenoglycol	1.5	1.5
² Ultrapure water	q.s.p. 100.0 g	q.s.p. 100.0 g
³ Carbopol [®] Ultrez 10 NF 5%	6.0	6.0
⁴ Imidazolidinylurea solution 50%	0.6	0.6
⁴ Triethanolamine	0.15	0.15

(1) Oil phase; (2) Aqueous phase; (3) Gel phase; (4) Complementary phase.

Physicochemical characterization and stability of the semisolid formulations

After preparation, the formulations were characterized in relation to physicochemical characteristics, and the stability was evaluated for a period of 30 days.

Macroscopic analysis

The formulations studies were evaluated in relation to their organoleptic characteristics, such as color, odor and appearance.

Determination of pH

For the determination of pH, a potentiometer previously calibrated with buffer solutions pH 4.0 and 7.0 was used. The samples were diluted in distilled water, in the concentration of 10% (m/m). The results were expressed by mean of three determinations.

Centrifugation test

The physical stability of the formulations was evaluated using 5 g of the samples, and centrifuged at 3000 rpm, during 30 minutes²².

Spreadability test

The spreadability was determined at room temperature, according to the parallel plate method²³. For the test, a plate glass mold was placed on a supporting glass plate. The sample was introduced into the plate hole-mold (1cm) and the surface was leveled. The mold plate was carefully removed and glass plates of known weight were placed over the sample. In intervals of one minute, the images were captured using the desktop scanner²⁴. The ImageJ software (Version 1.47, National Institutes of Health, USA) was used to calculate the spread areas obtained from the scanned images. The spreadability factor (*Sf*) was calculated (n=3)

and expresses the capacity expansion of a formulation on a flat surface when one gram of added weight is about the same, according to the equation:

$$Sf = A / W$$

Where: Sf (mm²/g) is the spreading factor; A = maximum spread area, and W = total weight added.

Viscosity and rheological properties evaluation

The viscosity and rheological behavior of the formulations were evaluated using a rotational viscometer Brookfield model LVDV-II+Pro, with a sensor SC4-25 and small sample adapter. The analyses were made at 25 ± 2 °C, using a water bath thermostated, and 4 points were recorded using a shear rate interval of 0.22 s^{-1} . The results were analyzed with the Rheocalc software (V3.1-1 version, Brookfield Instruments, UK) and, in order to establish the non-Newtonian behavior, different flow models were analyzed: Bingham ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$), Ostwald ($\tau = \kappa\dot{\gamma}^n$) and Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}^n$), where τ is the shear stress, τ_0 is the yield stress, η is the viscosity, κ is the consistency index, n is the flow index and $\dot{\gamma}$ is the shear rate.

In vivo anti-inflammatory activity

The induction model of the granulomatous tissue formation was accomplished by following protocol described by Bastos *et al* (2007)²⁵, with adaptations. For the assay, male rats were used. The animals were divided into groups of six animals each, and were anesthetized intraperitoneal with 100 μL of xilazin (Syntec, Cotia, SP, Brazil) and 100 μL of ketamin (Syntec). Lengthwise incision was carried on the backs of animals and one cotton pellet (previously sterilized and weighing 5 mg) was introduced subcutaneously. This incision was sutured closed using surgical sutures and treatment was initiated the next day. Rats were treated topically with semisolid formulations (GC_{OB} and GC). The treatment occurred by a period of six days by applying daily 50 mg of gel-cream at the incision site for 30 seconds. On the seventh day, the animals were sacrificed. The cotton pellet was removed and dried at 40 °C for 24 h, and their weight determined and reduced the initial value.

Statistic analysis

The results were expressed in terms of mean and standard deviation (SD, n=3). The statistical analysis of the results was carried out through the variance analysis (ANOVA), with the significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization and stability of the semisolid formulations

Pharmaceutical preparations, gel-cream type, are products with lower fat and gives a less greasy appearance, being better accepted by the consumer²⁶. So the choice of this pharmaceutical form for the development of this work.

The formulations (GC_{OB} and GC) presented white color, characteristic odor of the excipients and homogeneous aspect. The organoleptic properties were maintained throughout the storage period, and did not present changes regardless of different storage temperatures.

The test centrifugation is employed to accelerate phenomena such as creaming, flocculation, coalescence and phase separation that otherwise would occur during storage²⁷. The centrifugal force, which formulations studied were submitted, did not promote its physical instability after preparation and during 30 days.

The pH analysis is important because this reveal changes that may occur during the storage period, to ensure compatibility between the components of the formulation and also to prevent skin irritation²⁸. The gel-cream containing the borage oil (GC_{BO}) showed pH value acceptable to topical application and remained during the period of storage ($p > 0.05$). Moreover, the presence of oil in the gel-cream provided significant decrease in pH ($p < 0.05$) this can be explained by the presence of fatty acid composition of the oil (30% of γ -linolenic acid) (Table 2).

Table 2. pH values of the semisolid formulations (n = 3, mean \pm SD)

Formulations	pH		
	Time 0*	30 days	
		25 °C	40 °C
GC	6.04 \pm 0.05	6.03 \pm 0.12	6.00 \pm 0.05
GC _{OB}	5.63 \pm 0.11	5.77 \pm 0.11	5.65 \pm 0.10

*: 24 h after preparation.

The spreadability study of topical formulations aims to predict the behavior of semisolid after applying a given force, and is related to the application of the site of action²⁹. Moreover, this test evaluates the stability of formulations for detecting changes in the consistency of the products. Semisolid topical formulations have been studied using this test to evaluate their stability^{23,30}.

The spreadability values on the weight were plotted graphically, as represented in Figure 1. In order to assess the influence of storage conditions in relation to this characteristic, the spreadability factor was calculated for each formulation (Table 3).

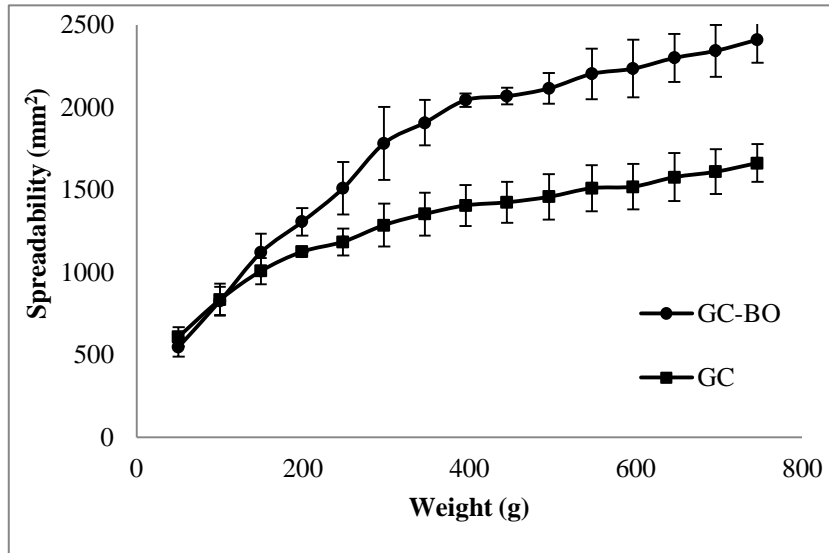


Figure 1. Graphical representation of spreadability (E_i) versus weight (g) for the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) after preparation.

In relation to spreadability areas, difference between the semisolid formulations was observed. The presence of borage oil in the gel-cream increased the spreadability area when a weight above 149.57 g was added. The spreadability factor values for gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) were 2.23 ± 0.08 and 3.23 ± 0.19 mm²/g, respectively, and significant difference ($p < 0.05$) was verified for the semisolid formulations. During the storage period at 25 and 40 °C, the spreadability factor decreased significantly compared after preparation ($p < 0.05$). The values obtained were: 2.12 ± 0.09 and 2.03 ± 0.04 mm²/g for GC, and 2.53 ± 0.07 and 2.31 ± 0.21 mm²/g for GC_{BO} , at 25 and 40 °C, respectively. This can be explained by loss suffered through water formulations, according to experimental test (date not showed).

Other factor studied, which also evaluates the spreadability and adhesion of the skin formulations, is the evaluation of rheological properties. This predicts the behavior of the formulations, assists in processing the product, is related to the removal of the filling and packaging material, with product acceptability by the user and the stability of the sample^{29,31,32}. Viscosity is a measure that evaluates the performance of the product over time

and determines the appropriate fluidity or consistency, and indicates whether there is adequate stability²².

Based on the results obtained, the gel-creams showed non-Newtonian flow behavior, not having a direct linear relationship between the shear stress and the shear rate applied³³. Moreover, the formulations showed thixotropy desirable property to obtain a better removal of the packaging material and provide better spreadability³⁴. The rheograms (Figures 2) were analyzed by mathematical parameters and the model that best describes the flow of the gel-creams was Casson (correlation higher than 0.97). This model has a yield value to start the flow of molecular layers and describes the plastic behavior of systems³⁵.

According to the Casson model, the viscosity (η) and yield value (τ_0) of the gel-creams were calculated. It was shown that the presence of oil influence significantly the viscosity of the formulations ($p < 0.05$) and the same was observed for the yield values (Table 3). After the storage period at 25 °C, the gel-cream containing the borage oil showed a significant increase in viscosity ($p > 0.05$), confirming the results obtained in spreadability. This difference was not observed in the formulation without oil, and it is confirmed that the oil causes changes in the consistency of the gel-cream. Due to the high water content lost in the formulations, the viscosity determination after the storage period of 30 days at 40 °C, cannot be performed in accordance with the parameters set forth in the analysis.

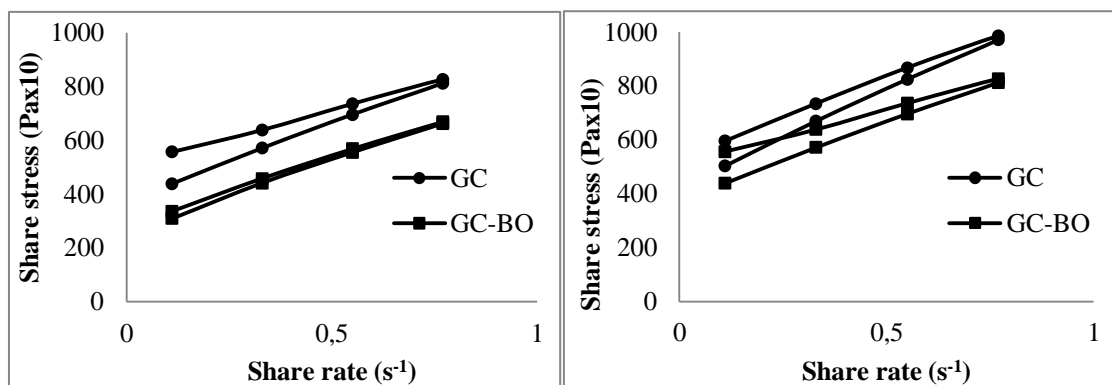


Figure 2. Rheograms of the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}). (A) After preparation; (B) After 30 days at 25 °C.

Table 3. Values of viscosity (η) and yield (τ_0) of the gel-cream base (GC) and gel-cream containing borage oil (GC_{BO}) after preparation and 30 days of storage at 25 °C (n = 3; mean \pm SD)

Formulations	η (mPa.s)		τ_0 (Pa)	
	Time 0*	30 days	Time 0*	30 days
GC	18643 \pm 2888	22913 \pm 3024	241 \pm 27	307 \pm 17
GC _{OB}	8569 \pm 68	20231 \pm 99	348 \pm 9	294 \pm 10

*: 48 h after preparation.

Antiinflammatory activity

In this work, the anti-inflammatory activity of the gel-cream containing borage oil was evaluated according to the induction of granulomatous tissue model. This test is used for evaluating the activity of anti-inflammatory reliably, because the cotton pellet is able to interfere with the proliferative components of the inflammatory process³⁷. The granuloma formation at the site in which the cylinder was implanted initially involves the accumulation of fluid and protein material with neutrophil infiltration. On the sixth day the granuloma is characterized by the formation of a vascularized fibrous capsule containing fibroblasts and infiltrating mononuclear cells; therefore, to interpret the results the lower fibrous capsule higher the anti-inflammatory effect of the active substance^{36,37,38}. The weight of the granuloma and the percentage of its formation were evaluated after six days of treatment with semisolid formulations (Table 4).

Table 4. Anti-inflammatory activity of the gel-cream containing the borage oil (GC_{BO}) and gel-cream base (GC) (n = 6; mean \pm SD)

Formulations	Mean weight of the granuloma (mg)	Inhibition of granuloma formation (%)
GC	63.36 \pm 4.59	-
GC _{BO}	37.82 \pm 5.00	58.87 \pm 4.99

The gel-cream containing the borage oil (GC_{OB}) showed activity and a significant difference in anti-inflammatory activity when compared to the gel-cream base (p<0.05) (Table 4). In the group treated with the GC_{OB} was observed a decrease of 38.87% of the weight of granuloma formed in relation to control group (treated with GC). These results

corroborate previous studies on the anti-inflammatory action of borage oil, which demonstrated that the oil in its original form was able to reduce inflammation in humans^{20,21}.

CONCLUSION

In this work it was possible to obtain a semisolid preparation (gel-cream) containing the borage oil with satisfactory physicochemical characteristics to topical application: appropriate pH value, satisfactory rheological conditions. In addition, the *in vivo* anti-inflammatory activity was evaluated and has confirmed the efficacy of borage oil against inflammatory reactions.

REFERENCES

1. Santos, S. (2010) In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. Fundamentos de Dermatologia – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu.
2. Leung, D.Y.M.; Boguniewicz, M.; Howell, M.D.; Nomura, I.; Hamid, Q.A. (2004) *The J Clin Invest* 113: 651 – 657.
3. Lipozencic, J.; Ljubojevic, S. (2010) *Dermatite Atópica*. In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. Fundamentos de Dermatologia – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu.
4. Castro, A. P. M.; Jacob, C.M.A.; Pastorino, A.C.; Grumach, A.S. (1995) *Ped* 17: 79-85.
5. Alvarez, A.M.R. & Rodríguez, M.L.G. (2000) *Gra acei* 51: 74-96.
6. Ribeiro, M.A.; Esquivel, M.M.; GIL, M.G. (2007) *Ing* 141-143.
7. Ismail, A.; Marjan, Z.M.; Foong, C.W. (2004) *Food Chem* 87: 581-586.
8. Siger, A.; Nogala-Kalucka, M.; Lampart-Szczpa, E. (2007) *J Food Lip* 15: 137-149.
9. Engler M.M. (1993) *Prost Leuk Essen Fat Ac* 49: 809–814.
10. Barre, D.E. (2001) *A of Nut Met* 45: 47–57.
11. Brosche, T.; Platt, D. (2000) *Arc Gerontol Ger* 30: 139-150.
12. Foster, R. H.; Hardy, G.; Alany, R.G.(2010) *Nut* 26:708-718.
13. Lu, Y.; Foo, L. Y. (2003) *Food Chem* 80: 71-76.
14. Langer, T., Franz, C.(1997) *Scien Pharm*65: 321–328.
15. Hafid, R.E.; Blade, S.F.; Hoyano, Y. (2002) *Ind Crops Prod* 16: 193-199.
16. Cunha, A.P., Silva, A.P; Roque, O.R.; Cunha, E. (2004) *Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
17. Gilani, A.H.;Bashir, S.; Khan, A.-U. (2007) **J Ethnopharm** 114: 393–399.
- 18 Andreassi, M.; Forleo, P.; Di Iorio, A.; Masci, S.; Abate, G.; Amerio, P. (1997) *J Int Med Res* 25: 266–274.
- 19 Linnamaa, P.; Savolainen, J.; Koulu, L.; Tuomasjukka, S.; Kallio, H.; Yang, B.; Vahlberg, T.; Tahvonen, R.(2010) *Clin Exp Aller* 40: 1247–1255.
- 20 Henz, B.M.; Jablonska, S.; Van DE Kerkhof, P.C.M.; Stingl, G.; Blasczyk, M.; Vandervalk, P.G.M.; Muggli, R.; Raederstorff, D. (1999) *Braz J Dermatol* 140: 685–688.
- 21 Conforti, F.; Sosa, S.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G.A.; Uzunov, D.; Tubaro, A.; Menichini, F.; Loggia, R.D. (2008) *J Ethnopharm* 116: 144–151.
- 22 Brasil. (2004) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA 1:52.
- 23 Borghetti, G.S. & Knorst, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo fitosolares. *Rev. Bras. Cien. Farma.* 42(4): p. 531-537, 2006.

- 24 Rigo, L.A.; Weber, J.; Silva, C.B.; Beck, R.C.R. (2012) *Lat. Am. J. Pharm.* **31** (10): 1387-91.
- 25 Bastos, L.F.S.; Merlo, L.A.; Rocha, L.T.S.; Coelho, M.M. (2007) *Eur J Pharma.* 55 : 349-356
- 26 Tanner, P.R. (2006) *Dermatol Clin* 24:53-62.
- 27 Rieger, M.M. (2001) *Emulsões*. In LACHMANN, L.; LIEBERMAN, H.A. & KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2:855-906.
- 28 Georgetti, S.R.; Casagrande, R.;Vicentini, F.T MC; Verri, WA.; Fonseca, M.J.V. (2006) *Eur J Pharm and Biopharm* 64:99–106.
- 29 GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A.K. Spreading of Semisolid Formulations. **Pharmaceutical Technology**, p.84-105, 2002.
- 30 Friedrich, M.; Primo, F.T.; Funck, J.A.B. (2007) *Acta Farm. Bonaer.* 26(4): 558-562.
- 31 Mambro, V.M.D.; Borin, M.F.; Fonseca, M.J.V. (2003) *J of Pharm and Biomed Anal* 32: 97.
- 32 Sinko, P. J. (2006) *Chemical Kinetics and Stability*. In: P. J. Sinko, Ed. Martin's. Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Lippincott William & Wilkins, Baltimore.
- 33 Kim, J.; Song, J.; Lee, E.; Park, S. (2003) *Colloid and Pol Sci* 281:614-623.
- 34 Mewi, J. & N.J. Wagner (2009) *Adv. Colloid. Interfac.* 147-148:214-27.
- 35 Lachman, L.; DeLuca, P.; Akers, M. J. (2001) *Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química*. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- 36 Bailey, P.J.; Sturm, A.; Lopez-Ramos, B. (1982) *Bioc Pharm* 31:1213-1218.
- 37 Dalmora, M.E.A. (1996) *Intereção do piroxicam com microemulsão catiônica e β -cliclodextrina: Formulação in vitro e avaliação biológica*. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Brasil. Dissertação de Mestrado.
- 38 Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. (2001) *Pharm* 53:597652.

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LÍPIDICO CONTENDO ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LÍPIDICO CONTENDO ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

2.1 Apresentação

O tratamento tópico de distúrbios cutâneos vem sendo cada vez mais explorado uma vez que oportunizam um direcionamento da substância ativa no local de ação, além de ser uma terapia não-invasiva. Todavia, o estrato córneo atua como uma barreira frente a penetração de fármacos ou substâncias, sendo assim a penetração cutânea um grande desafio no desenvolvimento de formulações tópicas (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). Para aumentar a biodisponibilidade e modular a penetração cutânea de substâncias tem-se buscado novas estratégias, dentre as quais destacam-se os sistemas nanoestruturados.

Assim, o presente capítulo aborda o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem e dipropionato de betametasona para o tratamento de dermatite atópica. Foram realizados os estudos de fotodegradação e liberação *in vitro* do fármaco a partir das suspensões coloidais. Adicionalmente, avaliou-se a incorporação dos nanocarreadores em hidrogéis (Carbopol[®] Ultrez e Cellosize[®]), sendo realizada a caracterização físico-química e o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das formulações semissólidas em estudo. Ainda nesse capítulo, será apresentado o estudo *in vivo* realizado com os hidrogéis, através de método de indução de tecido granulomatoso.

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por lesões eczematosas e coceira intensa, e geralmente associada com outras doenças, como rinite, asma e urticária (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). O aumento da produção de IgE, a imunodeficiência (IgA seletiva e IgM), o aparecimento de linfócitos T CD4+ na pele e a prejudicada imunidade celular são fatores causais da doença, somados a fatores ambientais e genéticos. Ainda, alterações no metabolismo dos ácidos graxos foram observadas em pacientes com dermatite atópica, com uma redução nos níveis de ácido γ -linolênico (ω -6) e ácido digama-linolênico. Estes ácidos são importantes para a estrutura e a fisiologia da pele, produtos com elevado potencial para a modulação da inflamação, respostas proliferativas e imunológicas (LEUNG, 2004; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010; RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

O tratamento mais utilizado para a dermatite atópica é o emprego de corticosteróides (dipropionato de betametasona, propionato de clobetasol, desonida, hidrocortisona, dexametasona, entre outros), antibióticos, imunomoduladores, macrolídeos, ciclosporina, anti-histamínicos e o uso de fototerapia (SANTOS et al., 2010). Cabe salientar que a terapia com corticosteróides tem desvantagens pelo perfil dos fármacos, que podem provocar atrofia da pele, erupções, exacerbação de vírus ou de bactérias (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Para contornar estes efeitos, o uso de óleos vegetais com propriedades emolientes e hidratantes constitui uma alternativa, os quais, dependendo de suas propriedades terapêuticas, podem atuar sinergicamente com os fármacos.

Os óleos vegetais ricos em ω -6 são capazes de auxiliar na função de barreira da pele e influenciar na resposta inflamatória, como o óleo de borragem, o óleo de groselha preta e o óleo de prímula (BROSCHÉ; PLATT, 2000; FOSTER et al., 2010). O óleo de borragem, obtido das sementes de *Borago officinalis* L., apresenta propriedades emoliente, antipirética, diurética e anti-inflamatória. A sua constituição é rica em ácidos graxos essenciais, sendo mais abundante o ácido γ -linolênico (cerca de 30%), além de um elevado grau de ácidos poli-insaturados (que faz com que seja susceptível à oxidação) e a presença de tocoferóis e outros componentes fenólicos (SOTO; CONCHA; ZUNIGA, 2008). Para o tratamento de doenças da pele (psoríase e dermatite atópica), o óleo de borragem demonstrou resultados satisfatórios, utilizado isoladamente ou em combinação com fármacos (ANDREASSI, 1997; ENGLER, 1993; BROSCHÉ; PLATT, 2000; BARRE, 2001; CONFORTI et al., 2008; LINNAMAA et al., 2010; FOSTER et al., 2010).

A nanotecnologia tem sido descrita como uma alternativa para minimizar os efeitos adversos, proteger a substância ativa de fenômenos externos, promover uma liberação controlada e direcionar o fármaco para o local de ação (SCHAFFAZICK et al., 2003; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Entre os sistemas nanoestruturados de interesse farmacêutico se destacam as nanocápsulas poliméricas, as quais apresentam estrutura vesicular, constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, onde fármaco pode ser disperso ou dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER, 2009). Devido modificações na composição, nanocápsulas com um núcleo hidrofóbico contendo uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano) foram desenvolvidas, sendo essas designadas por nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 2013). A presença do óleo pode influenciar nas características do sistema, como tamanho de partículas e índice de polidispersão, e auxiliar na sua estabilidade (FREITAS, 2006; ZULFAKAR et al., 2010; KHOEE & HOSSAINZADEH, 2010; ESMAELLI et al., 2011; RIGO et al., 2011).

A inclusão de nanopartículas em bases semissólidas (géis ou emulsões) é uma opção para ultrapassar os obstáculos apresentados pelos sistemas nanoestruturados. As formulações buscam proporcionar proteção tópica para a área exposta da toxicidade e irritação, e também influencia nas propriedades reológicas e espalhabilidade do produto a ser aplicado sobre a pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A fim de agregar as vantagens demonstradas pelos sistemas nanoestruturados e o uso de óleos vegetais, este estudo foi delineado no sentido de preparar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona, propondo-se, também, ao desenvolvimento de formulações semissólidas do tipo hidrogéis contendo as nanocápsulas em estudo e avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* das preparações em modelo de indução de tecido granulomatoso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O óleo de borragem foi obtido da empresa Mundo dos Óleos (Brasília, DF, Brasil); poli(ϵ -caprolactona) – PCL (Mn = 70.000-90.000) e monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil); polissorbato 80 (Tween[®] 80); hidroxietilcelulose (Cellosize[®] QP-100) e imidazolidinylurea (Germal[®] 115) foram comprados da Delaware (Porto Alegre, Brasil); o Carbopol[®] Ultrez 10NF foi adquirido da

Fragon (São Paulo, Brasil); o dipropionato de betametasona foi obtido da Valdequímica Produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil); acetonitrila grau cromatográfico foi obtida da Tedia (São Paulo, Brasil). Os demais solventes e reagentes foram de grau analítico ou farmacêutico e foram usados como recebidos.

2.2 Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

2.2.1 Teste de inchamento/dissolução do polímero

Para o teste, filmes de, aproximadamente, 0,03 g de PCL foram obtidos com auxílio de prensa hidráulica (Hydraulic Press P30000, Bovenau, Brasil), durante 5 minutos a 5 toneladas. Cada filme foi exatamente pesado e em seguida imerso no óleo de borragem (volume de 2 mL) ($n = 3$). Em intervalos de tempo de 1, 3, 7, 15 e 30 dias, os filmes foram retirados do contato com o óleo (com auxílio de pinça), secos em papel absorvente e, em seguida, novamente pesados (WEISS-ANGELI et al., 2008).

2.2.2 Preparação das suspensões nanoestruturadas

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dipropionato de betametasona (NC_{OB}-DB) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores (1988). Para tal, uma fase orgânica composta por um tensoativo de baixo EHL (Span[®] 60), o polímero (PCL), o óleo de borragem (OB) e o fármaco foram dissolvidos em acetona, sob agitação de uma hora e aquecimento a temperatura de 40 °C. Após, esta solução foi injetada em uma fase aquosa composta por um tensoativo de alto EHL (Tween[®] 80) e mantida sob agitação magnética moderada durante 10 minutos. A suspensão foi concentrada em evaporador rotatório, a fim de obter uma concentração de 0,5 mg/mL de betametasona. Suspensões de nanocápsulas sem o fármaco (NC_{OB}) foram, também, preparadas e avaliadas para comparação. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e acondicionadas em frascos de vidro âmbar para posterior análise. A composição quali-quantitativa das suspensões está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas.

Componentes	Quantidade*	
	NC _{OB-DB}	NC _{OB}
Dipropionato de betametasona	16 mg**	-
Óleo de borragem	458 mg	458 mg
PCL	250 mg	250 mg
Span [®] 60	95,7 mg	95,7 mg
Acetona	132,5 mL	132,5 mL
Tween [®] 80	191,5 mg	191,5 mg
Água UP	132,5 mL	132,5 mL

* equivalente a 25mL.

** : equivalente a 12,5 mg de betametasona.

2.2.3 Caracterização físico-química das suspensões coloidais

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem, com e sem fármaco, foram avaliadas em relação as suas propriedades físico-químicas. As análises foram realizadas em triplicata, para cada lote de formulação.

A determinação do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersão (PDI) foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons, em Zetasizer[®] (ZEN 3600, Malvern Instruments), a temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas em água ultrapura, na proporção de 1:500 (v/v). A determinação do potencial zeta foi realizada por mobilidade eletroforética, no mesmo equipamento empregado para a avaliação do tamanho das partículas, após diluição das amostras em solução de NaCl 10 mM (1:500, v/v).

O pH foi determinado diretamente nas suspensões, utilizando potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil) com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

As nanocápsulas foram avaliadas em relação à morfologia das partículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Jeol, JEM 1200 Exll, Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, Brasil). Para a análise, as suspensões foram diluídas em água ultrapura (10 x, v/v), depositadas no *grid* de amostras e tratadas com acetato de uranila (2%). Após, foram armazenadas em dessecador (24 h) para posterior análise.

O teor de betametasona nas nanocápsulas foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-20A, composto por bomba LC-20AT e detector de fotodiodo (PDA) SPD-M20A. A fase móvel foi constituída

pela mistura de acetonitrila:água (65:35, v/v); fluxo isocrático de 1,0 mL/min e detecção a 254 nm. Empregou-se uma coluna Luna[®] C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA) e pré-coluna do mesmo fabricante (4,0 x 2,0 mm, 5 µm). O volume de injeção foi de 20 µL. As condições cromatográficas seguiram as recomendações da Farmacopéia Britânica (2010) e o método foi validado seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005). Para a extração do fármaco, uma alíquota das nanocápsulas (200 µL) foi diluída em acetonitrila (a fim de obter uma concentração de 10 µg/mL de betametasona), submetida à sonicação por 10 minutos e, após, o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. A solução foi filtrada em membrana de celulose regenerada (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo.

A quantidade de fármaco associado às nanocápsulas (eficiência de encapsulamento) foi determinada no ultrafiltrado por CLAE, após a separação das nanocápsulas pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra 10.000 MW, Millipore, Bedford, EUA). Uma quantidade de 400 µL das suspensões foi utilizada e submetida à ultrafiltração-centrifugação, a 2.200 xG durante 10 min. A eficiência de encapsulamento foi calculada a partir da diferença entre a concentração total do fármaco e a concentração no ultrafiltrado (concentração livre).

2.2.4 Avaliação da estabilidade a temperatura ambiente

As suspensões de nanocápsulas com e sem fármaco (NC_{OB}-DB e NC_{OB}) foram avaliadas em relação a sua estabilidade a temperatura ambiente. Os testes empregados compreenderam: pH, determinação do diâmetro médio das partículas, polidispersão, potencial zeta e teor de fármaco. As análises foram realizadas em intervalos de tempo de 7 e 15 dias após a sua preparação.

2.2.5 Estudo de fotodegradação

Para o estudo, a suspensão de nanocápsulas contendo o fármaco (NC_{OB}-DB) foi exposta à luz ultravioleta artificial UVC (Phillips TUV - UVC longa vida, 30 W). As amostras (1,0 mL) foram colocadas, individualmente, em cubetas transparentes fechadas (Brand[®] ultra-micro UV-Cuvettes, 12,5 mm x 45 mm x 12,5 mm) e expostas à radiação em câmara espelhada (1 m x 25 cm x 25 cm). Uma solução do fármaco (0,64 mg/mL, equivalente a 0,5 mg/mL de betametasona) em acetonitrila (S-DB) foi empregada para comparação. Em intervalos de tempo de pré-estabelecidos, uma alíquota de 600 µL de cada amostra foi coletada e diluída em acetonitrila, conforme especificado na determinação do teor de fármaco, e a concentração de betametasona foi determinada por CLAE. A fim de eliminar a

possibilidade de degradação térmica, amostras protegidas da luz (controle escuro) foram, também, avaliadas.

Para determinar a cinética de degradação do fármaco, os dados obtidos foram plotados em gráficos de concentração de betametasona *versus* tempo (reação de ordem zero), logaritmo da concentração de betametasona *versus* tempo (reação de primeira ordem) e inverso da concentração de betametasona *versus* tempo (reação de segunda ordem). A constante de velocidade de degradação (k) e o tempo de meia-vida foram calculados (NUDELMAN, 1975; SINKO, 2006).

2.2.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* das nanocápsulas núcleo lipídico contendo dipropionato de betametasona

A liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas foi realizada empregando a técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000-14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA), utilizando água:etanol (70: 30, v/v) como meio de liberação. Para comparação, uma solução do dipropionato de betametasona em acetonitrila (0,64 mg/mL, equivalente a 0,5 mg/mL de betametasona) foi, também, avaliada. Os sacos de diálise (contendo 1,0 mL das amostras em estudo) foram colocados em béqueres contendo 150 mL de meio de liberação, mantidos sob agitação magnética a uma temperatura de 35 °C. Em tempos predeterminados, alíquotas de 1,0 mL de meio foram coletadas, repondo-se o mesmo volume de meio fresco. A concentração do fármaco liberado foi determinada por CLAE, de acordo com as condições analíticas utilizadas para a determinação do teor de betametasona. Devido à baixa concentração de fármaco no meio de liberação, uma nova validação do método foi realizada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os perfis de liberação *in vitro* do fármaco foram analisados por modelagem matemática (MicroMath Scientist[®] para Windows[™]), utilizando os seguintes modelos dependentes: ordem zero, monoexponencial, biexponencial e Lei das Potências. O modelo apropriado foi escolhido com base no melhor coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção (MSC) e melhor configuração gráfica.

2.3 Formulações semissólidas

2.3.1 Preparação e caracterização físico-química das formulações

Para a preparação das formulações semissólidas contendo as nanoestruturas foram escolhidos dois tipos de polímeros formadores de gel: carbômero (Carbopol[®] Ultrez 10NF, caráter aniônico) e hidroxietilcelulose (Cellosize[®] QP-100, caráter não-iônico).

A preparação do gel com Carbopol[®] Ultrez foi realizada pela dispersão do polímero na suspensão de nanocápsulas, contendo o conservante (imidazolidiniluréia), sob agitação por 10 minutos. Após, a trietanolamina foi adicionada para a formação do gel. Para a preparação do gel contendo hidroxietilcelulose, o polímero foi disperso na suspensão de nanocápsulas, sob agitação por duas horas. Para a preparação dos géis contendo o fármaco não associado, primeiramente o dipropionato de betametasona foi dissolvido em etanol (sete gotas) e após, juntamente com o polímero, foram dispersos em água.

Os hidrogéis foram nomeados da seguinte forma: G1-NC_{OB}-DB (hidrogel de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona); G1-NC_{OB} (hidrogel de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de óleo de borragem); G1-DB (hidrogel de Carbopol[®] Ultrez contendo dipropionato de betametasona não associado ao nanocarreador); G2-NC_{OB}-DB (hidrogel de Cellosize[®] QP-100 contendo nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona); G2-NC_{OB} (hidrogel de Cellosize[®] QP-100 contendo nanocápsulas de óleo de borragem) e G2-DB (hidrogel de Cellosize[®] QP-100 contendo dipropionato de betametasona não associado ao nanocarreador). A composição quali-quantitativa dos hidrogéis se encontra nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Composição quali-quantitativa dos hidrogéis preparados com Carbopol[®] Ultrez 10NF

Componentes	Quantidade (g)*		
	G1-NC _{OB} -DB	G1-NC _{OB}	G1-DB
NC _{OB} -DB	24,675	-	-
NC _{OB}	-	24,675	-
DB	-	-	0,016
Carbopol [®] Ultrez	0,125	0,125	0,125
Imidazolidiniluréia	0,150	0,150	0,150
Água ultrapura	-	-	24,675
Trietanolamina	0,05	0,05	0,05

* Quantidade relativa a 25 g de hidrogel.

Tabela 3. Composição quali-quantitativa dos hidrogéis preparados com Cellosize® QP-100

Componentes	Quantidade (g)*		
	G2-NC _{OB} -DB	G2-NC _{OB}	G2-DB
NC _{OB} -DB	24,475	-	-
NC _{OB}	-	24,475	-
DB	-	-	0,0016
Natrosol®	0,375	0,375	0,375
Imidazolidiniluréia	0,150	0,150	0,150
Água ultrapura	-	-	24,475

* Quantidade relativa a 25 g de hidrogel.

2.3.2 Caracterização físico-química dos hidrogéis

Os hidrogéis foram avaliados em relação as suas propriedades físico-químicas, compreendendo: análise macroscópica (cor, odor e aspecto), teor de fármaco, pH, avaliação da presença das nanoestruturas, determinação da espalhabilidade, viscosidade e comportamento reológico.

Para a extração do fármaco dos hidrogéis, uma alíquota das amostras (200 mg) foi dispersa em acetonitrila (10 µg/mL de betametasona) e a solução foi colocada em sonicador durante 10 minutos; após, o volume foi completado com o mesmo solvente e a solução foi levada a centrifugação por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e filtrado em membrana de celulose regenerada (0,45 µm) para posterior análise por CLAE. As condições cromatográficas seguiram as descritas para quantificação do fármaco nas nanocápsulas (item 2.2.3). O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade e precisão. A exatidão do método foi inferida tendo em vista os resultados obtidos na validação da metodologia analítica para a quantificação do fármaco nas nanocápsulas (ICH, 2005).

Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil) com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Os hidrogéis foram dispersos em água (10%, m/m) e os resultados foram expressos pela média de três determinações.

A fim de verificar a presença das nanoestruturas nos hidrogéis, o tamanho médio de partículas foi determinado por espectroscopia correlação de fótons (Zetasizer® ZEN 3600, Malvern Instruments). As amostras foram dispersas em água ultrapura (1:500, m/v) e mantidas sob agitação por 30 minutos e após centrifugadas por 10 minutos.

A avaliação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Borguetti e Knorst (2006) e modificada por Rigo e colaboradores (2013). Para o teste, uma placa molde circular de vidro foi colocada sobre uma superfície de vidro. A amostra foi introduzida no orifício (1,0 cm) da placa molde e a superfície foi nivelada com auxílio de espátula. Cuidadosamente, a placa molde foi removida e placas de vidro de peso conhecido foram colocadas, individualmente, sob a amostra, em intervalos de um minuto. Em cada tempo de análise, a imagem obtida foi capturada com auxílio de digitalizador (Rigo *et al.*, 2013). O software ImajeJ (Versão 1.47, National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para calcular as áreas obtidas a partir das imagens digitalizadas. Para elucidação dos resultados, o fator de espalhabilidade (Fe) foi calculado, o qual expressa a capacidade de expansão de uma formulação em uma superfície plana quando um grama de peso é adicionado sobre a mesma (equação abaixo). As análises foram realizadas em triplicata, a temperatura ambiente.

$$Fe = A / P$$

Onde:

FE (mm²/g) = fator de espalhabilidade

A = área máxima de espalhabilidade

P = peso total adicionado

A avaliação da viscosidade e do comportamento reológico dos hidrogéis foram realizadas com auxílio do viscosímetro rotacional Brookfield modelo LVDVII+ Pro (Middleborough, Estados Unidos), com adaptador para pequenas amostras e sensor de cisalhamento SC4-25. As análises foram realizadas a temperatura de 25 ± 2 °C, e quatro (0,022 a 0,154 s⁻¹) e oito (0,22 a 1,76 s⁻¹) pontos diferentes foram registrados, em intervalos de um minuto, para os hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez e Cellosize[®] QP-100, respectivamente. Os resultados foram analisados com auxílio do software Rheocalc (V3.1-1 versão, Brookfield Instruments, UK), afim de estabelecer o comportamento de fluxo das formulações, de acordo com os seguintes modelos: Bingham ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$), Ostwald ($\tau = k\dot{\gamma}^n$) e de Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}^n$), onde τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão de cisalhamento limite, η é a viscosidade, k é o índice de consistência, n é o índice de fluxo e $\dot{\gamma}$ é a velocidade de cisalhamento.

2.3.3 Estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis

Para o estudo utilizaram-se células de difusão verticais do tipo Franz (n = 6), com área de difusão de 1,77 cm² e volume de meio receptor de 7,0 mL. A composição do meio receptor

foi solução de etanol:água (30:70), atendendo as condições *sink*, o qual foi mantido a temperatura de 35 ± 1 °C e sob agitação constante (3.000 rpm). Uma membrana de diálise (porosidade 12.000-14.000 Da, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi empregada como barreira de liberação (ANDRADE et al., 2014). Na superfície da membrana 0,5 g de cada formulação foi cuidadosamente espalhada e em intervalos de tempo pré-determinados (0,5; 1, 4, 6 e 8 horas), alíquotas do meio receptor foram coletadas (200 µL), repondo-se o mesmo volume de meio fresco. A concentração de fármaco liberado foi determinada por CLAE, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 2.2.6.

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco foi analisado pela modelagem matemática (MicroMath Scientist[®] para Windows[™]), utilizando o modelo de Higuchi.

2.3.4 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória dos hidrogéis foi realizada de acordo com o modelo de indução da formação de tecido granulomatoso, descrito por Bastos e colaboradores (2007), com adaptações. Para o ensaio, ratos Wistar (aproximadamente 250 g) foram empregados e divididos em grupos de seis animais. Cada animal foi anestesiado com 100 µL de xilazina (Syntec) e 100 µL de quetamina (Syntec) para injeção intraperitoneal. Uma incisão longitudinal foi realizada no dorso dos animais e um *pellet* de algodão (previamente esterilizado e pesando 5 mg) foi introduzido por via subcutânea. A incisão foi fechada com suturas cirúrgicas e o tratamento foi iniciado no dia seguinte. Os ratos foram tratados topicamente com os hidrogéis contendo as nanocápsulas (G1-NC_{OB}-DB, G1-NC_{OB}, G2-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}) e com o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) por um período de seis dias, pela aplicação diária de 50 mg da formulação no local da incisão, durante 30 segundos. No sétimo dia, os animais foram sacrificados, o *pellet* de algodão foi removido e seco a 40 °C, durante 24 h. Após, o seu peso foi determinado e comparado ao peso inicial.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de inchamento/dissolução do polímero

As nanocápsulas são sistemas vesiculares formadas por um núcleo, geralmente, oleoso, envolto por uma camada de polímero, e para se obter uma estrutura estável é essencial que o óleo não dissolva o polímero, pois a incompatibilidade destes componentes pode acarretar na formação de micelas (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Neste trabalho, realizou-se, de forma inédita, a preparação de nanocápsulas de PCL contendo como núcleo o óleo de borragem, e o teste de inchamento/dissolução do polímero foi realizado a fim de verificar a influência do óleo sob o polímero. Durante 30 dias os filmes poliméricos foram mantidos em contato com o óleo e mantiveram o seu peso inicial ($0,0286 \pm 0,001$ g, $p > 0,05$) (Figura 1), confirmando que o óleo de borragem não interagiu com o polímero. Com este resultado foi possível empregar o óleo na preparação de nanocápsulas, visando a sua associação com dipropionato de betametasona.

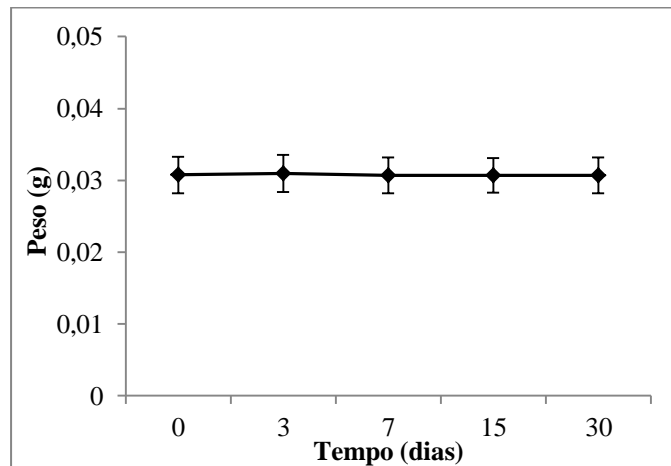


Figura 1. Peso dos filmes poliméricos (n = 3).

3.2 Caracterização físico-química e estudo estabilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico

Após a preparação, a análise macroscópica das suspensões revelou que todas apresentaram aspecto leitoso, homogêneo, opalescente com reflexo azulado (efeito *Tyndal*), relacionado ao movimento browniano dos sistemas coloidais (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Considerando os resultados, observou-se que as formulações apresentaram tamanho nanométrico de partículas (210 ± 3 nm e 185 ± 3 nm para NC_{OB-DB} e NC_{OB}, respectivamente) e índice de polidispersão abaixo de 0,10 (NC_{OB-DB}: $0,05 \pm 0,04$; NC_{OB}: $0,06 \pm 0,02$), o que configura a homogeneidade dos sistemas. Esses valores encontrados para o tamanho de partículas corroboram com estudos já realizados, utilizando o mesmo método de preparação (BERNARDI et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009;

FLORES et al., 2011; HARTEER, 2013). Na figura 2 estão apresentados os resultados da análise de distribuição do tamanho médio das partículas. A presença do fármaco resultou em um leve aumento no diâmetro médio das partículas ($p < 0,05$), resultado que está em acordo com alguns estudos, como verificado para o tioconazol (HARTEER, 2012) e clotrimazol (SANTOS et al., 2013).

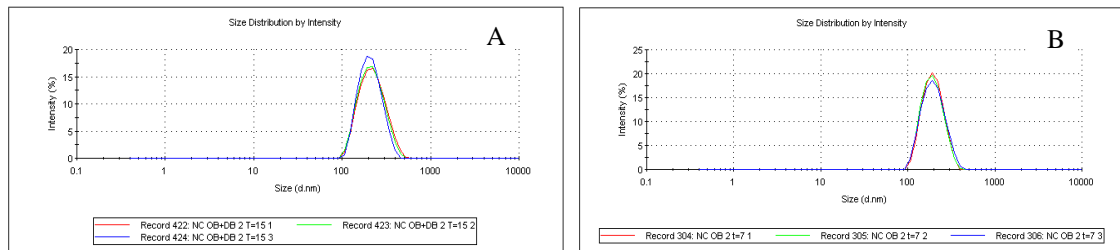


Figura 2. Distribuição do tamanho de partículas das nanocápsulas, analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) NC_{OB-DB} ; (B) NC_{OB} .

No que se refere à caracterização da superfície das partículas, o potencial zeta das nanocápsulas foi determinado (Figura 3). As nanocápsulas preparadas com o óleo de borragem, com e sem o fármaco, apresentaram valores negativos ($-16,6 \pm 1,1$ mV e $-9,3 \pm 1,2$ mV, respectivamente). Estes valores negativos estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura para nanocápsulas preparadas com PCL e polissorbato 80 (OURIQUER et al., 2008; FLORES et al., 2011; SAVIAN, 2012; HARTEER, 2013). Cabe salientar que o potencial zeta das nanopartículas está relacionado com a natureza química do polímero e do pH do meio (MORA-HUERTAS et al., 2010). O fármaco aumentou, em módulo, o potencial zeta ($p < 0,05$), podendo este efeito estar relacionado à natureza fracamente ácida do fármaco.

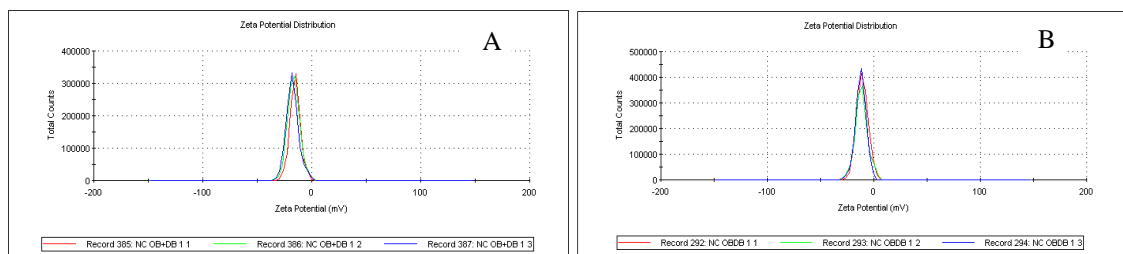


Figura 3. Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas poliméricas, analisadas por mobilidade eletroforética. (A) NC_{OB-DB} ; (B) NC_{OB} .

O pH das formulações mostrou-se ligeiramente ácido (6,0-6,2), devido, especialmente, a presença do óleo, o qual é constituído por ácidos graxos, e do polímero. A presença do

fármaco o valor de pH em comparação com a nanocápsulas sem o mesmo, possivelmente pela natureza fracamente ácida do dipropionato de betametasona.

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por MET e as fotomicrografias obtidas estão ilustradas na figura 4. As imagens demonstraram que as nanocápsulas apresentam formato esférico e os diâmetros encontrados foram semelhantes aos obtidos por espalhamento dinâmico de luz.

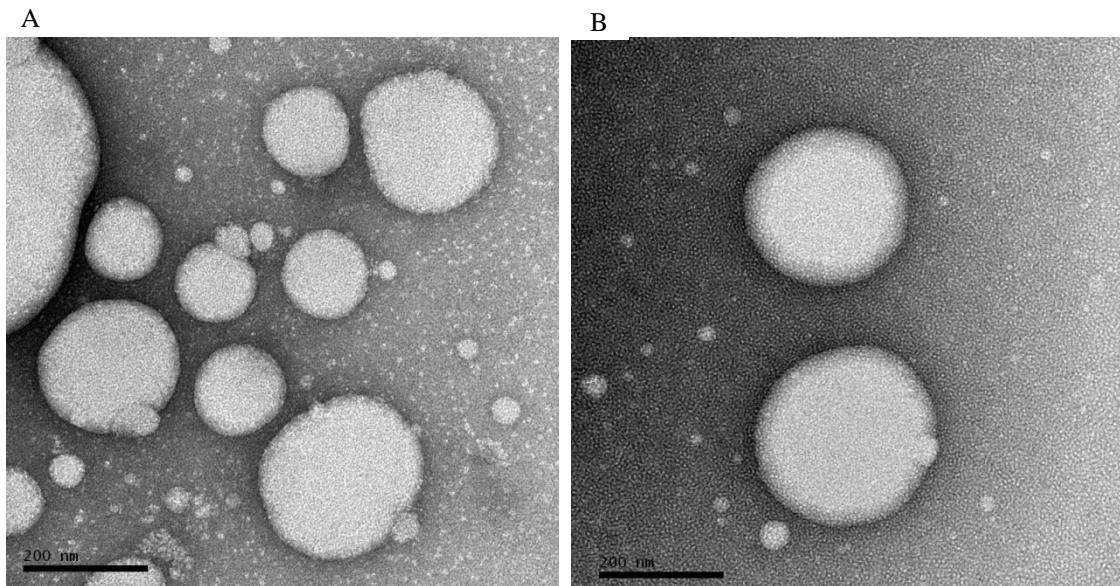


Figura 4. Imagens por MET das nanocápsulas poliméricas. (A) NC_{OB}-DB (150,000 x; bar = 200 nm); (B) NC_{OB} (150,000 x; bar = 200 nm)

Para a quantificação do teor de betametasona nas nanocápsulas o método analítico foi validado. A especificidade do método foi confirmada pela pureza do pico específico (índice de pureza de pico = 1,000) e ausência de picos adicionais no cromatograma das soluções obtidas com as nanocápsulas sem o fármaco. O método se mostrou linear na faixa de concentração de 1,0 a 40,0 µg/mL ($y = 49039x - 25662$; $r^2 = 0,9997$). A análise estatística demonstrou regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 13233,74 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e não haver desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 3,02 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$). O método foi considerado preciso (DPR de 1,31 e 1,98 para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e exato (% de recuperação = $99,98 \pm 1,34$) de acordo com as condições analíticas empregadas.

O teor de betametasona foi próximo ao valor teórico ($0,50 \pm 0,03$ mg/mL), indicando que não houve perda de fármaco durante o processo de preparação das nanocápsulas. A eficiência de encapsulamento foi de, aproximadamente, 100%. Comparando este resultado com outro tipo de sistema nanoestruturado, as nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas

nesse trabalho apresentaram uma taxa de associação maior que os lipossomas desenvolvidos por Gillet e colaboradores (2011).

As nanocápsulas foram avaliadas em relação à estabilidade a temperatura ambiente, por um período de 15 dias. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 5 e 6 e na tabela 4.

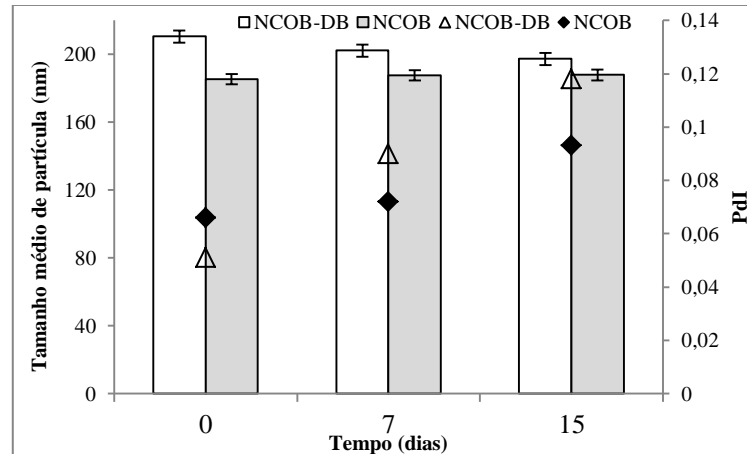


Figura 5. Representação gráfica do tamanho médio das partículas e do índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de borragem (NC_{OB}) e dipropionato de betametasona (NC_{OB-DB}) determinados no estudo de estabilidade à temperatura ambiente.

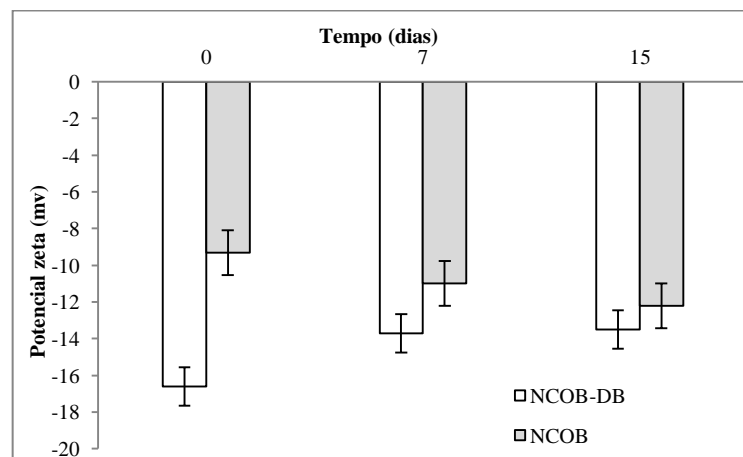


Figura 6. Representação gráfica do potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de borragem (NC_{OB}) e dipropionato de betametasona (NC_{OB-DB}) determinados no estudo de estabilidade à temperatura ambiente.

Tabela 4. Valores de pH obtidos para as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem (NC_{OB}) e dipropionato de betametasona (NC_{OB}-DB) após preparação (tempo zero) e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (n = 3, média ± s)

Tempo (dias)	NC _{OB}	NC _{OB} -DB
0	6,23 ± 0,04	6,06 ± 0,08
7	5,85 ± 0,09	5,52 ± 0,13
15	5,12 ± 0,23	5,13 ± 0,22

Durante o período de armazenamento, as NC_{OB} não apresentaram mudanças em relação ao diâmetro e polidispersão ($p > 0,05$); entretanto, para a nanocápsula contendo o fármaco (NC_{OB}-DB) se verificou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nestes parâmetros em relação aos valores iniciais, porém, o valor de PDI foi inferior a 0,13, demonstrando a manutenção da homogeneidade dos sistemas durante 15 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Em relação ao potencial zeta, após o sétimo dia de armazenamento, uma diminuição em módulo foi verificada ($p < 0,05$).

O pH das nanoestruturas diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após os primeiros sete dias de armazenamento, o que pode ser explicado pela provável hidrólise das cadeias dos triglicerídeos presentes no óleo, resultando em um aumento na concentração de ácidos graxos livres e, também, pela hidrólise ou relaxamento das cadeias do polímero (CALVO et al., 1996; SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2008). O teor de fármaco, parâmetro importante para a avaliação da estabilidade, permaneceu constante e próximo ao valor teórico (0,5 mg/mL de betametasona) ($p > 0,05$).

3.3 Estudo de fotodegradação

O estudo de fotodegradação foi realizado para observar a capacidade de fotoproteção das nanocápsulas em proteger, bem como verificar possíveis reações de degradação que possam ocorrer neste processo. As formulações foram expostas à luz UVC, uma fonte mais energética, com o objetivo de acelerar a velocidade das reações e reduzir o tempo do experimento. Cabe salientar que na literatura não há relato de estudo de degradação para o dipropionato de betametasona nas condições empregadas.

Os resultados obtidos estão expressos na figura 7. O teste foi realizado até se obter aproximadamente 60% de degradação do fármaco, a fim de determinar a ordem e a cinética de degradação.

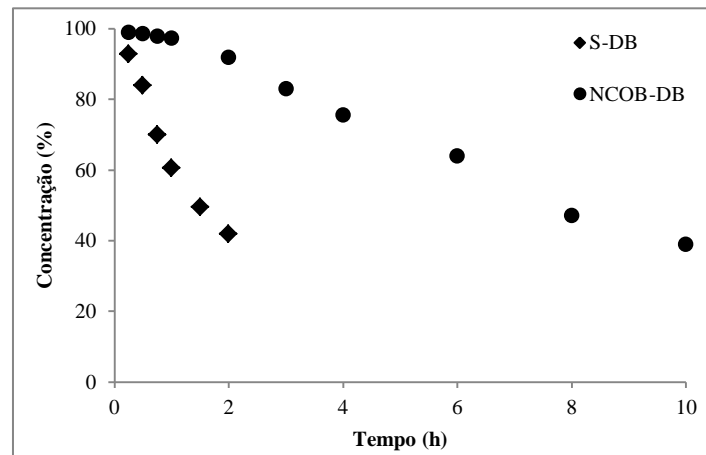


Figura 7. Teor residual de betametasona em função do tempo após exposição da solução do fármaco em acetonitrila (S-DB) e nanocápsulas de núcleo lipídico (NCOB-DB) à luz UVC.

Analisando os resultados verificou-se a influência das nanocápsulas de núcleo lipídico na proteção do fármaco frente à luz UVC, resultado que está em acordo com estudos realizados com a tretinoína (OURIQUE et al., 2008), benzofenona-3 (ALMEIDA et al., 2009) e tioconazol (HARTER, 2013). Ao final do experimento (10 h), 61% do fármaco degradou a partir da suspensão de nanocápsulas, enquanto que para a solução do fármaco, uma degradação de 58% foi observada em 2 h. Essa maior estabilidade das nanoestruturas pode ser explicada pela presença do polímero (PCL), o qual é capaz de refletir e espalhar a radiação UV e assim proporcionar uma maior proteção do fármaco frente à luz (JIMÉNEZ et al., 2004). Cabe destacar que as amostras protegidas da luz (controle escuro) não apresentaram redução da concentração de betametasona, mantendo o seu teor próximo a 100%, demonstrando que não houve influência da temperatura na degradação do fármaco. Lin e colaboradores (2009) demonstraram a formação de um produto de degradação, dipropionato de lumi-betametasona, a partir do estudo de fotoisomerização induzida por luz artificial UVC de uma solução de dipropionato de betametasona, caracterizando e identificando mudanças no anel-A através de cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear.

De posse dos resultados, a cinética de degradação do fármaco a partir das nanocápsulas e da solução foi estimada de acordo com o melhor coeficiente de correlação (r). Tanto as nanoestruturas quanto a solução do fármaco livre apresentaram cinética de primeira ordem, demonstrando que a velocidade de reação depende da concentração da substância ativa. A partir da ordem encontrada a constante de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$)

foram calculados. O tempo de meia vida do dipropionato de betametasona quando encapsulado foi de 7,18 h ($k = 0,0965 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) e quando em solução de 1,5 h ($k = 0,4617 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Ou seja, as nanocápsulas foram capazes de aumentar 4,8 vezes o tempo necessário para que a concentração do fármaco reduzisse em 50%.

3.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona

Uma das vantagens das nanopartículas é a sua capacidade em controlar a liberação das substâncias ativas e, com isso, proporcionar doses constantes destas no local de ação. Neste trabalho, o estudo de liberação do dipropionato de betametasona a partir das nanocápsulas de núcleo lipídico foi realizado em comparação com a uma solução do fármaco (não associado ao nanocarreador). A partir dos resultados pode-se verificar a capacidade das nanocápsulas em modificar a liberação do fármaco quando comparadas com a solução deste em acetonitrila (Figura 7). Em 12 h praticamente 80% do fármaco foi liberado a partir das nanocápsulas, enquanto que para a solução, se verificou uma liberação de, aproximadamente, 100%.

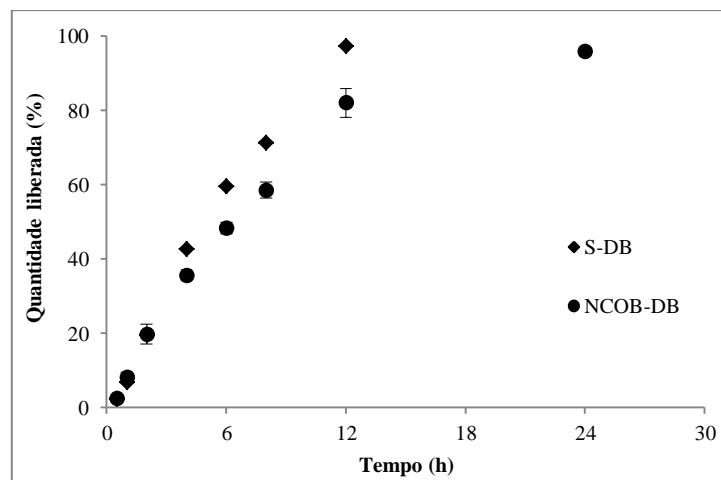


Figura 8. Perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir da suspensão de nanocápsulas (NC_{OB}-DB) e solução em acetonitrila (S-DB).

A partir da modelagem matemática, determinou-se o perfil de liberação do dipropionato de betametasona, e o modelo monoexponencial ($r > 0,99$) é o que melhor descreve a liberação do fármaco a partir das amostras analisadas (NC_{OB}-DB: $k = 0,12 \pm 0,01$; S-DB: $k = 0,14 \pm 0,00$). A equação de primeira ordem (monoexponencial) indica que a liberação do fármaco ocorre em um único estágio e não apresenta uma liberação inicial rápida ou efeito *burst*. Até o tempo de duas horas não se obteve diferença na quantidade de dipropionato de

betametasona liberada pela solução e pela NC_{OB}-DB ($p > 0,05$); entretanto, após esse período, a formulação do fármaco nanoencapsulado possibilitou uma menor liberação do mesmo.

O tempo de meia-vida foi calculado e pode-se observar que as nanoestruturas mantiveram uma liberação do fármaco mais lenta em relação à respectiva solução (NC_{OB}-DB: $t_{1/2} = 6,83 \pm 0,72$; S-DB: $t_{1/2} = 4,74 \pm 0,06$).

O mecanismo de liberação foi avaliado pela lei das potências (Power Law), a qual estabelece valores limites para o expoente de liberação (n): $n = 0,43$ indica difusão Fickiana; $0,43 < n < 0,85$ corresponde a transporte anômalo, e $n \geq 0,85$ está associado com transporte caso II. O valor obtido para as nanocápsulas foi 0,67, indicando um transporte anômalo, o que significa que a liberação do fármaco é controlada pelo relaxamento das cadeias do polímero seguido da difusão do dipropionato de betametasona.

3.5 Hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados a fim de contornar dificuldades previstas pelas formulações aquosas, e ainda, a escolha por dois polímeros formadores de gel deve-se as diferentes características apresentadas por esses. Os carbômeros (Carbopol[®]) são polímeros sintéticos derivados do ácido acrílico, de caráter aniônico, e diferentes tipos são encontrados (Carbopol[®] 934, Carbopol[®] 940, Carbopol[®] 980, Carbopol[®] Ultrez, entre outros). Neste trabalho optou-se pela escolha do Carbopol[®] Ultrez tendo em vista sua maior facilidade de dispersão e seu uso já conhecido na preparação de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas, conforme demonstrado em alguns trabalhos (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2011; OURIQUE et al., 2011). Além deste, empregou-se a hidroxietilcelulose (Cellosize[®]), e devido a sua natureza não-iônica, o mecanismo de liberação das matrizes a partir deste é independente do pH, além de apresentar menor toxicidade e potencial de irritação.

Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos na caracterização físico-química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC_{OB} e G2-NC_{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) (n = 3, média ± s).

Formulações	pH	Fe*	Diâmetro médio (nm)	Teor (mg/mL)
G1-NC _{OB}	5,95 ± 0,01	2,13 ± 0,12	227 ± 4	-
G1-NC _{OB} -DB	5,88 ± 0,15	2,55 ± 0,14	224 ± 5	0,499 ± 0,003
G1-DB	5,86 ± 0,02	3,09 ± 0,13	480 ± 6	0,499 ± 0,001
G2-NC _{OB}	6,01 ± 0,04	5,12 ± 0,15	194 ± 2	-
G2-NC _{OB} -DB	6,13 ± 0,07	5,34 ± 0,10	193 ± 3	0,499 ± 0,003
G2-DB	6,05 ± 0,04	5,79 ± 0,08	257 ± 4	0,499 ± 0,002

G1: hidrogel de Carbopol[®] Ultrez; G2: hidrogel de Cellosize[®].

*: fator de espalhabilidade

Os hidrogéis apresentaram coloração branca (géis contendo as suspensões de nanocápsulas com e sem fármaco) e incolor (géis contendo o fármaco não associado), odor característico dos constituintes da formulação e aspecto homogêneo. O pH dos hidrogéis apresentou valores levemente ácidos (5,8-6,2) e na faixa aceitável para aplicação tópica, não se observando mudanças em relação às suspensões. Esse resultado está em acordo com o estudo realizado por Fontana e colaboradores (2011), no qual nanocápsulas de propionato de clobetasol foram incorporadas em hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez e não apresentaram mudanças no pH. Hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de dexametasona foram desenvolvidos e foi evidenciado que o pH não foi influenciado pela incorporação das nanocápsulas (MARCHIORI et al., 2010). Ainda, diferenças entre os polímeros geleificantes foram verificadas (p<0,05), o que pode ser devido a sua natureza química.

Em relação ao tamanho médio das partículas após dispersão dos hidrogéis em água, os valores encontrados mantiveram-se na faixa nanométrica e próximos aos observados para as suspensões originais (210 ± 3 nm e 185 ± 3 nm para NC_{OB}-DB e NC_{OB}, respectivamente). Géis de Carbopol[®] Ultrez contendo propionato de clobetasol apresentaram nanocápsulas intactas, após incorporação (FONTANA et al., 2011). O teor de betametasona nos hidrogéis ficou próximo ao valor teórico (0,5 mg/g).

As preparações semissólidas desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas em relação à espalhabilidade, viscosidade e comportamento reológico, características importantes para

aplicação tópica. A espalhabilidade busca prever o comportamento da formulação após certa força aplicada e está relacionada à aplicação no local de ação, além de avaliar a estabilidade do produto em relação a possíveis alterações (GARG et al., 2002; BORGHETTI & KNORST, 2006). Para sua avaliação, o fator de espalhabilidade das formulações foi calculado (Tabela 5). De posse dos resultados verificou-se que os géis de Cellosize[®] apresentaram maior área de espalhabilidade em relação aos géis preparados com Carbopol[®] Ultrez ($p < 0,05$). Além disso, a presença do fármaco aumentou significativamente o fator de espalhabilidade, para ambos os hidrogéis ($p < 0,05$). Este resultado corrobora com os obtidos por Fontana e colaboradores (2011) na avaliação da espalhabilidade de hidrogéis contendo nanocápsulas de propionato de clobetasol.

O comportamento reológico de formulações semissólidas influencia na espalhabilidade, retenção e tempo de contato com a superfície da pele, sendo fundamental na avaliação da qualidade final do produto (BATHEJA et al., 2011). As características reológicas foram avaliadas utilizando um viscosímetro rotacional e os resultados estão demonstrados na figura 8. As formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram comportamento de fluxo não-Newtoniano, pois não se observou relação linear entre os valores de tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento. Além disso, todos os hidrogéis adequaram-se ao modelo de Herschel-Bulkley ($r > 0,98$; $n < 1$), o qual descreve o comportamento pseudoplástico dos mesmos. Sistemas de comportamento pseudoplástico demonstram uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003). Quando o produto sofre uma tensão as moléculas tendem a se desembaraçar, alinhando-se na direção do fluxo, proporcionando, assim, menor resistência ao fluxo e, esse fato, aliado à liberação de água que estava aprisionada, contribui para a diminuição da viscosidade (AULTON, 2005). Outros trabalhos demonstraram o mesmo comportamento de fluxo quando nanocápsulas poliméricas foram incorporadas em géis de Carbopol[®] Ultrez (FONTANA, et al., 2011; OURIQUE et al., 2011)

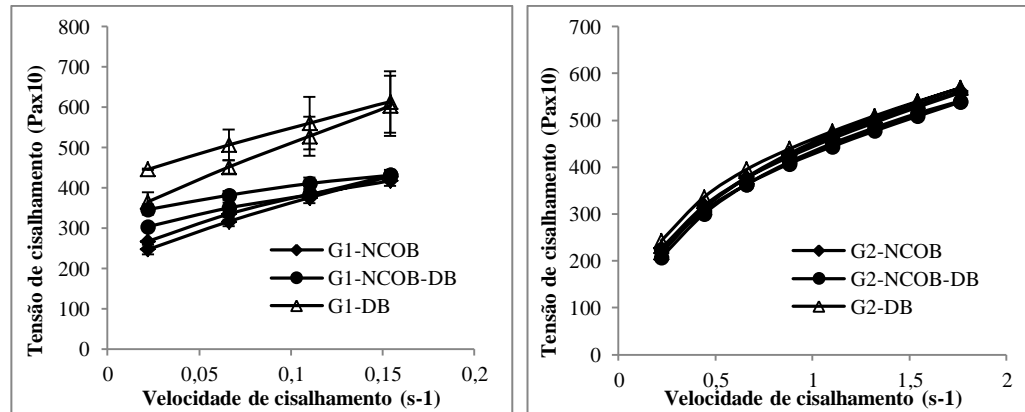


Figura 9. Reogramas dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC_{OB} e G2-NC_{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) (n = 3, média ± s).

Os valores de índice de fluxo (n), consistência (k) e tensão de cisalhamento limite (τ_0) foram calculados (tabela 8) e diferenças entre os hidrogéis preparados com o mesmo polímero não foram verificadas; entretanto, os hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez apresentaram valores mais elevados quando comparados aos hidrogéis de Cellosize[®], corroborando com os resultados obtidos no teste espalhabilidade.

Comparando os índices de consistência das formulações, os géis preparados com o polímero Carbopol[®] Ultrez apresentaram valores maiores em relação aos géis de Cellosize[®] (p<0,05), e essa maior consistência está relacionada à propriedade de doador de viscosidade que os ácidos carboxivinílicos apresentam (PAESE et al., 2009). Ainda, o índice de consistência de ambos hidrogéis aumentou com a incorporação das nanoestruturas. Em relação ao valor de cedência, a partir dos resultados é possível perceber a necessidade de uma tensão de cisalhamento inicial maior para os hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez, o que corrobora com o seu valor de consistência e viscosidade elevados.

Tabela 6. Valores de índice de fluxo (n), índice de consistência (k) e tensão de cisalhamento limite (τ_0) para os hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC_{OB} e G2-NC_{OB}) e hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) ($n = 3$, média \pm s).

Formulação	n	k (mPa.s)	τ_0 (Pa)
G1-NC _{OB}	0,98 \pm 0,20	171351 \pm 3054	334,1 \pm 10,2
G1-NC _{OB} -DB	1,00 \pm 0,15	143961 \pm 2975	263,3 \pm 13,9
G1-DB	0,90 \pm 0,12	126447 \pm 2226	178,1 \pm 14,8
G2-NC _{OB}	0,29 \pm 0,15	77135 \pm 4054	126,5 \pm 12,6
G2-NC _{OB} -DB	0,32 \pm 0,45	60800 \pm 2778	118,7 \pm 19,8
G2-DB	0,28 \pm 0,10	56150 \pm 2381	115,8 \pm 7,3

3.5.1 Estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis

Neste trabalho, um estudo de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona foi realizado, empregando como barreira a membrana de diálise (porosidade de 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O estudo foi conduzido utilizando doses infinitas (aproximadamente, 500 mg de formulação). A partir dos resultados verificou-se que, independente do polímero formador de gel utilizado, o fármaco não associado aos nanocarreadores apresentou maior liberação quando comparados às formulações contendo as nanocápsulas poliméricas (Figura 9). Após 8 horas de ensaio, a formulação G1-NC_{OB}-DB promoveu a liberação de 9,99 \pm 0,45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (7,0%) e a G2-NC_{OB}-DB de 11,32 \pm 1,23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (8,0%); as formulações contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) liberaram 12,27 \pm 1,29 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (8,6%) e 12,52 \pm 1,36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (8,8%), respectivamente. Com os resultados evidencia-se que o tipo de polímero geleificante não influenciou na liberação do fármaco ($p > 0,05$).

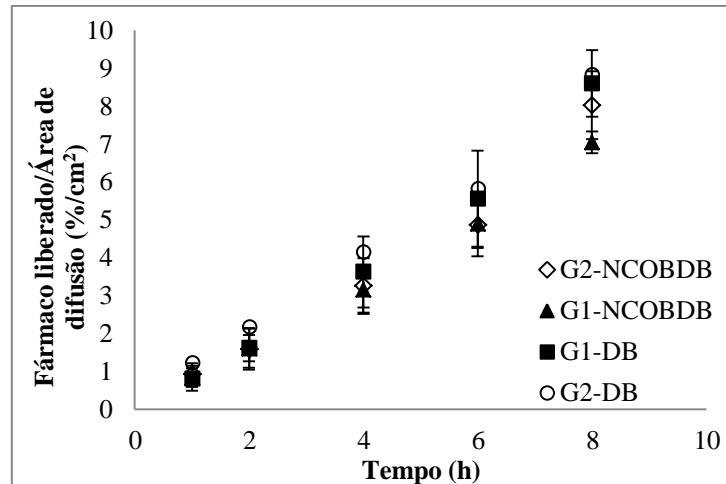


Figura 10. Perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir dos hidrogéis em função do tempo (h).

Através da modelagem matemática, de acordo com o modelo de Higuchi, as constantes de velocidade foram calculadas (G1-NC_{OB}-DB: $1,92 \pm 0,23 \text{ h}^{-1}$; G1-DB: $2,51 \pm 0,16 \text{ h}^{-1}$; G2-NC_{OB}-DB: $1,93 \pm 0,37 \text{ h}^{-1}$ e G2-DB: $2,55 \pm 0,40 \text{ h}^{-1}$). Os valores obtidos para os hidrogéis contendo as nanocápsulas foram significativamente inferiores aos hidrogéis contendo o fármaco não associado ao nanocarreador ($p < 0,05$), demonstrando que os sistemas foram capazes de diminuir a velocidade de liberação do dipropionato de betametasona a partir dos hidrogéis. Além disso, pode-se confirmar que a presença do polímero influenciou na liberação do fármaco. Ainda, o tipo de polímero empregado para a preparação do gel não influenciou na constante de velocidade do fármaco ($p > 0,05$). Esses resultados corroboram com outros trabalhos que demonstraram a capacidade das nanocápsulas em controlar a liberação do fármaco a partir de hidrogéis (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2011; HARTEK, 2013).

3.5.2 Indução da formação de tecido granulomatoso

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória tópica dos hidrogéis e a influência das nanocápsulas na ação do fármaco, o ensaio de formação de tecido granulomatoso foi realizado, através da implantação de um *pellet* de algodão no dorso do animal. O tratamento, realizado durante seis dias, foi iniciado um dia após a incisão dorsal e implantação do *pellet*. Posteriormente, o granuloma foi retirado e pesado para comparação com o peso inicial. Através do peso é possível observar a formação de tecido granulomatoso e calcular a inibição de formação de granuloma. Como formulações controle foram utilizadas os hidrogéis base, os quais não continham o óleo de borragem e o fármaco (G1 – gel Carbopol[®]

Ultrez e G2 – gel Cellosize[®]), os quais não apresentam atividade. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 5.

Todas as formulações foram capazes de inibir a formação do granuloma. Os géis contendo o fármaco não associado não diferiram significativamente dos géis contendo as nanocápsulas (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB (p>0,05). Estudos realizados com a dexametasona e diclofenaco incorporados em sistemas nanoestruturados para aplicação tópica também demonstraram não haver diferença nos valores de atividade anti-inflamatória para o fármaco livre ou nanoencapsulado (MILÃO et al., 2001; BECK et al. 2003). Porém, o gel de Carbopol[®] Ultrez contendo somente o óleo de borragem (G1-NC_{OB}) apresentou um menor índice de inibição (aproximadamente 16,21 %) quando comparado aos géis contendo o fármaco não associado (G1-DB) e ao gel contendo as nanoestruturas (G1-NC_{OB}-DB) (p<0,05). Para o gel preparado com Cellosize[®], as formulações contendo as nanocápsulas e o fármaco não associado não diferiram entre si, independente da presença de fármaco (p>0,05).

Tabela 7. Peso médio dos *pellets* antes e após a indução da inflamação para os animais tratados com os hidrogéis contendo nanocápsulas de dipropionato de betametasona (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB), nanocápsulas sem o fármaco (G1-NC_{OB} e G2-NC_{OB}), hidrogel contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) e hidrogel base (**G1 e G2**) (n = 6, média ± s)

Formulação	Peso médio do granuloma (mg)	Inibição da formação do granuloma (%)
G1	36,33 ± 4,34	-
G1-DB	22,18 ± 6,07	33,82 ± 5,23
G1-NC_{OB}-DB	26,83 ± 4,32	27,60 ± 4,89
G1-NC_{OB}	31,82 ± 5,10	16,21 ± 5,04
G2	30,20 ± 6,19	-
G2-DB	22,62 ± 6,19	26,73 ± 6,68
G2-NC_{OB}-DB	21,60 ± 4,65	19,25 ± 8,03
G2-NC_{OB}	23,75 ± 0,65	17,03 ± 2,95

4 CONCLUSÃO

As nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas neste trabalho apresentaram: tamanho nanométrico de partículas e adequada homogeneidade (baixo índice de polidispersão); teor de fármaco próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento de cerca de 100%. A inclusão do dipropionato de betametasona nas nanocápsulas possibilitou maior proteção do fármaco frente à luz artificial UVC e, ainda, adequado controle na liberação *in vitro*. Hidrogéis contendo os nanocarreadores foram preparados e apresentaram características adequadas para aplicação tópica e possibilitaram alterar o perfil de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona. O teste *in vivo* evidenciou a atividade anti-inflamatória tópica do fármaco e do óleo após sua inclusão nas nanocápsulas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALMEIDA, et al. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009b.
- ANDRADE, D. F. ; FONTANA, M. C. ; BECK, R. C. R. . Evaluation of Three Synthetic Membranes as Limiting Barrier for in vitro Drug Release Studies from Hydrogels Containing Polymeric Nanocapsules. **Current Nanoscience**, v. 10, p. 367-373, 2014.
- ANDREASSI, et al. Efficacy of Á-linolenic acid in the treatment of patients with atopic dermatitis. **Journao of International Medical Research**, v 25, p 266–274, 1997.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, RE 899, 2003.
- AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Trad George G. Ortega [et al.] 2 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.
- BARRE, D.E. Potential of Evening Primrose, Borage, Black Currant, and Fungal Oils in Human Health. **Annais of Nutrition Metabolism**, v 45, p 47–57, 2001.
- BASTOS, et al. **European Journal of Pharma**. v 55, p 349-356, 2007
- BATHEJA, P. et al. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 159–167, 2011.
- BECK et al. Nanoparticles containing dexamethasone: Physicochemical properties and anti-inflammatory activity. **Acta Farm. Bonaerense**, v 22, n 1, p 11-5, 2003.
- BERNARDI et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology** v 586, p 24–34, 2008.

- BORGHETTI, G.S. & KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo fitosolares. **Rev. Bras. Cien. Farma.** 42(4): p. 531-537, 2006.
- BROSCHÉ, T.; PLATT, D. Effect of borage oil consumption on fatty acid metabolism, transepidermal water loss and skin parameters in elderly people. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v 30, p 139-150, 2000.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, 530-536, 1996.
- 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.
- CHOI, M.J.; RUKTANONCHAI, U.; SOOTTITANTAWAT, A.; MIN, S.G. Morphological characterization of encapsulated fish oil with β -cyclodextrin and polycaprolactone. **Food Research International**, v 42, p 989-997, 2009.
- CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R.D. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v 116, p 144–151, 2008.
- ENGLER M.M. Comparative study of diets enriched with evening primrose, black currant, borage or fungal oils on blood pressure and pressor responses in spontaneously hypertensive rats. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v 49, p 809–814, 1993.
- ESMAEILI, A.; SAREMNIA, B.; KOOHIAN, A.; REZAZADEH, S. Mechanism of nanocapsules of *Matricaria recutita* L. extract formation by the emulsion-diffusion process. **Superlattices and Microstructures**, v 50, p 340–349, 2011.
- FARMACOPÉIA BRITÂNICA, v.2, London, 2010.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Journal of Pharmaceutics**, v 55, n 1, p R1-R4, 1989.
- FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.
- 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 nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254–263, 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. **European Journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FOSTER, R. H et al. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. **Nutrition**, v 26, p 708-718, 2010.

FREITAS, S.; HIELSCHER, G.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification—a useful tool for pharmaceutical development and production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v 3, n 1, p 76–85, 2006.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A.K. Spreading of Semisolid Formulations. **Pharmaceutical Technology**, p.84-105, 2002. Gillet e colaboradores (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.

HARTER, A. Desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

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.

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

KHOEE, S.; HOSSAINZADEH, M.T. Effect of O/S/W process parameters on 17 β -EV loaded nanoparticles properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v 75, n 1, p133–140, 2010.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M.D.; NOMURA, I.; HAMID, Q.A. New insights into atopic dermatitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v 113, n 5, p 651 – 657, 2004.

LIN, M.; LI, M; BUEVICH, A.V.; OSTERMAN, R.; RUSTUM, A.M. Rapid structure elucidation of drug degradation products using mechanism-based stress studies in conjunction with LC–MS n and NMR spectroscopy: identification of a photodegradation product of betamethasone dipropionato. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 50, p 275–280, 2009.

LINNAMAA, P.; SAVOLAINEN, J.; KOULU, L.; TUOMASJUKKA, S.; KALLIO, H.; YANG, B.; VAHLBERG, T.; TAHVONEN, R. Blackcurrant seed oil for prevention of atopic dermatitis in newborns: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical & Experimental Allergy**, v 40, p 1247–1255, 2010.

LIPOZENCIC, J.; LJUBOJEVIC, S. Dermatite Atópica. In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, 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: preparation, characterization, and in vitro drug releas

MILÃO, D. Desenvolvimento Tecnológico e avaliação biológica de formar farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. Dissertação de Mestrado –Programa de pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre.Brasil. 2001

MISHRA et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9–24, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010. NUDELMAN, 1975;

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

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, 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**, 5, 240-246, 2009.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

RIGO, L.A, RASCOVETZKI, R. H., BECK, R. C. R. Sunscreen formulations containg rice bran or soybean oil: Rheological properties, spreadability and in vitro Sun Protection Factor. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.2, p. 246-252, 2011.

RIGO, L.A.; WEBER, J.; SILVA, C.B.; BECK, R.C.R. Evaluation of the Spreadability of Pharmaceutical or Cosmetic Semisolid Formulations Using Scanned Images. **Latin American Journal of Pharmacy**. 31 (10): 1387-91 (2012)

SANTOS et al. In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATIAZZI, J.; ADAMS, A.I.H.; DENARDI, L.; ALVES, S.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C** v 33, p 1389–1394, 2013.

SAVIAN, A.L. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ditranol e sua incorporação em formulação semissólida de base aquosa. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHAFFAZICK, R. S. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 21, n 2, p 99-106, 2002.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64–71, 2008.

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

SOTO, C.; CONCHA, J.; ZUNIGA, M.E. Antioxidant content of oil and defatted meal obtained from borage seeds by an enzymatic-aided cold pressing process. **Process Biochemistry**, v 43, p 696–699, 2008.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v 26, n 5, 2009.

WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octylmethoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet Aradiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v 4, p 80-89, 2008.

ZULFAKAR, M.H.; ABDELOUAHAB, N.; HEARD, C.M. Enhanced topical delivery and ex vivo anti-inflammatory activity from a betamethasone dipropionate formulation containing fish oil. **Inflammation Research**, v 59, p 23-30, 2010.

DISCUSSÃO GERAL

Os produtos vegetais vêm sendo amplamente utilizados e estudados para aplicação tópica devido, principalmente, as suas propriedades anti-inflamatória, hidratante, antioxidante, emoliente e antimicrobiana (ISAMIL et al., 2004; SIGER et al., 2007). A utilização desses produtos deve-se a busca por terapias alternativas para o tratamento tópico de algumas doenças, sendo incorporados de forma individual ou como combinação terapêutica (NASCIMENTO et al., 2007).

Os óleos vegetais têm em sua composição, basicamente, triglicerídeos, mas contêm outras substâncias lipofílicas como alcoóis e ácidos graxos, hidrocarbonetos, vitaminas, fitosteróis, fosfatídeos, tocoferóis, entre outros (ALVAREZ & RODRIGUEZ, 2000; PLETNEV, 2003). A proporção e o tipo de ácidos graxos são os responsáveis por caracterizar o uso dessas matérias-primas (ALVAREZ & RODRIGUEZ, 2000). O alto teor de ácidos graxos insaturados é favorável ao estrato córneo, devido à semelhança desses produtos oleosos e o material encontrado na pele. Assim, os óleos atuam recuperando a camada lipídica cutânea. Dentre a variedade de ácidos graxos apresentados por esses produtos, os ácidos linolênico e linoleico se destacam pelo estímulo a mitose a nível epidérmico e o aumento da regeneração celular (RIBEIRO, 2006). As matérias-primas ricas em ácido γ -linolênico têm sido utilizadas em doenças de pele como psoríase e dermatite atópica (HUANG, 1999; BROSCHE; PLATT, 2000; FOSTER et al., 2010).

A nanotecnologia vem investindo no uso de substâncias vegetais por diversos motivos, sendo entre eles a vantagem do sinergismo terapêutico agregado ao núcleo oleoso, além das características dos óleos influenciarem nas propriedades nanocarreadoras (FREITAS, 2006; ZULFAKAR et al., 2010; RIGO et al., 2011). Visando essas vantagens, esse trabalho buscou estudar a utilização do óleo de borragem como núcleo oleoso de nanocápsulas poliméricas e, ainda, desenvolver formulações semissólidas utilizando-o como princípio ativo, associado ou não ao dipropionato de betametasona e/ou às nanopartículas.

O primeiro enfoque deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação semissólida do tipo creme-gel contendo o óleo de borragem, uma vez que estudos a cerca da aplicação tópica do óleo não são descritos na literatura. A escolha da forma farmacêutica foi devido ao creme-gel ser um produto de aspecto menos untuoso, de maior aceitação pelo público alvo e, ainda, pela possibilidade de incorporar substâncias lipossolúveis. Após a preparação, a formulação foi caracterizada quanto às suas características organolépticas,

centrifugação, pH, espalhabilidade, viscosidade e comportamento reológico. Adicionalmente, sua estabilidade foi avaliada por um período de 30 dias, as temperaturas de 25 °C e 40 °C.

Quanto ao aspecto, o creme-gel mostrou-se homogêneo, de coloração branca, e mudanças não foram observadas durante o período de armazenamento. O teste de centrifugação demonstrou a estabilidade física da formulação, pois fenômenos de sedimentação ou coalescência não foram observados. O pH do creme-gel foi levemente ácido e compatível ao uso cutâneo.

A determinação da espalhabilidade, característica importante para aplicação tópica, prevê o comportamento da formulação após certa força aplicada e está relacionada à aplicação no local de ação, além de avaliar a estabilidade do produto em relação a possíveis alterações (GARG et al., 2002). Para avaliação desse parâmetro o fator de espalhabilidade (Fe) foi calculado, o qual relacionada a área máxima espalhada e o peso total adicionado. O creme-gel contendo o óleo de borragem apresentou um valor inicial de $3,23 \pm 0,19 \text{ mm}^2/\text{g}$ e uma diminuição significativa foi verificada após 30 dias de armazenamento, independente da temperatura. Esta mudança na espalhabilidade da formulação está relacionada à perda de água observada durante o período de armazenamento, tendo em vista o tipo de embalagem empregada (semipermeável).

Outro parâmetro importante a ser avaliado e que está interligado a espalhabilidade é a viscosidade e o comportamento reológico das formulações. A viscosidade determina a fluidez ou a consistência apropriada do produto, indicando uma estabilidade adequada (BRASIL, 2004). O comportamento reológico influencia a espalhabilidade, retenção e tempo de contato com a superfície da pele, por isso sua importância na avaliação da qualidade final do produto (BATHEJA et al., 2011). As características reológicas foram avaliadas utilizando um viscosímetro rotacional e a partir dos resultados certificou-se que o creme-gel possui comportamento de fluxo não-Newtoniano, devido não haver relação linear entre os valores de tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento. Além disso, apresentou propriedade plástica (modelo de Casson) e tixotropia, características importantes para aplicação tópica.

Além da caracterização físico-química, a atividade anti-inflamatória *in vivo* do creme-gel foi avaliada através da indução de tecido granulomatoso. Esse ensaio baseia-se na implantação de um *pellet* de algodão (de peso conhecido) no dorso dos animais (ratos), após incisão. O tratamento inicia no primeiro dia após a incisão e é realizado por um período de seis dias, mediante aplicação tópica das formulações semissólidas (creme-gel contendo óleo de borragem e creme-gel base). Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram evidenciar a ação do óleo em inibir a formação do granuloma.

A segunda etapa deste trabalho consistiu no desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o óleo de borragem e sua associação com dipropionato de betametasona, para posterior incorporação em hidrogéis.

Devido ao ineditismo da utilização do óleo de borragem como núcleo oleoso das nanocápsulas, inicialmente o teste de inchamento/dissolução do polímero foi realizado, confirmando não haver interação entre o óleo e o polímero. Após, na etapa de desenvolvimento das suspensões, alguns obstáculos foram encontrados, especialmente na obtenção de partículas com tamanho e uniformidade adequadas. As primeiras formulações preparadas continham quantidades usuais de óleo (3,3%), Span[®] 60 (0,77%), Tween[®] 80 (0,77%) e solventes (água: 54 mL e acetona: 27 mL), porém, os resultados referentes ao tamanho médio de partículas e PDI (>0,35) não foram satisfatórios, indicando falta de homogeneidade do sistema; além de aparentemente as formulações apresentarem-se viscosas (ficavam aderidas à parede do frasco de armazenamento). Desta forma, mudanças foram realizadas quanto às quantidades de óleo e tensoativos, mas os mesmos problemas continuavam. Então, sabendo-se que a viscosidade do óleo pode afetar essas características (FREITAS, 2006; ALMEIDA et al., 2009; ESMAELLI et al., 2011), foi aumentada a quantidade da acetona na fase orgânica, isso para haver uma melhor solubilização do óleo e, conseqüentemente, uma diminuição na viscosidade da mesma. Com esta modificação, resultados satisfatórios foram obtidos.

Em relação às características macroscópicas, as suspensões mostraram-se homogêneas e leitosas quanto ao aspecto, de cor opalescente com reflexo azulado (efeito *Tyndal*). O tamanho de partículas manteve-se na faixa nanométrica (185-210 nm) e com PDI menor que 0,1, evidenciando a homogeneidade do sistema. A presença do fármaco alterou o tamanho de partícula ($p < 0,05$). Trabalhos realizados com o mesmo método de preparação corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho. Ourique e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas com os óleos de girassol e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico contendo tretinoína e obtiveram sistemas homogêneos, de tamanho nanométrico (220-230 nm) e PDI menor que 0,25. Santos e colaboradores (2013) prepararam nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol e observaram que a presença do fármaco influenciou no diâmetro médio das partículas das suspensões.

Quanto ao potencial zeta (carga da superfície das partículas), as suspensões apresentaram valores negativos (-9,0 a -16 mV). A presença do fármaco aumentou em módulo o potencial ($p < 0,05$), resultado que pode ser explicado pela característica fracamente ácida do dipropionato de betametasona. Os altos valores de potencial zeta indicam maior repulsão das

partículas, prevenindo a formulação de instabilidades físicas, como floculação, aglomeração e coalescência. Outros autores também demonstraram modificações no potencial zeta das nanocápsulas. Harter (2013) observou que o tioconazol promoveu uma redução, em módulo, do potencial zeta das nanocápsulas poliméricas, devido às características do fármaco. Ourique e colaboradores (2008) evidenciaram um aumento no potencial zeta de nanocápsulas poliméricas quando associadas à tretinoína. Já Almeida e colaboradores (2008) observaram que a benzofenona-3 quando incorporada em nanocápsulas poliméricas não alterou o potencial zeta, porém, o diferente tipo de núcleo oleoso influenciou nesse parâmetro, devido à composição de cada óleo.

Outra característica importante a ser determinada é o pH, sendo que para as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas nesse trabalho o pH manteve-se na faixa de 6,0 a 6,2 (ligeiramente ácido). Esse resultado pode ser explicado pela presença do óleo, com suas cadeias de ácidos graxos, e também pelo caráter fracamente ácido do fármaco. Além disso, a incorporação do dipropionato de betametasona acarretou em uma redução do pH ($p < 0,05$).

Para a quantificação do fármaco nas suspensões coloidais utilizou-se o método analítico preconizado pela Farmacopeia Britânica (2010). O método foi validado de acordo com os seguintes parâmetros: linearidade, especificidade, exatidão e precisão (ANVISA, 2003; ICH, 2005). A especificidade foi confirmada pela ausência de picos através de análise das suspensões sem a presença de fármaco (NC_{OB}) e pela pureza do pico cromatográfico. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 1,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$, preciso e exato de acordo com as condições analíticas empregadas.

O teor de fármaco após a preparação das nanocápsulas foi próximo ao valor teórico ($0,50 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$). A eficiência de encapsulamento foi de, aproximadamente, 100%, resultado satisfatório comparado aos lipossomas de dipropionato de betametasona desenvolvidos por Gillet e colaboradores (2011). Savian (2012) também demonstrou a capacidade de nanocápsulas poliméricas em melhorar a eficiência de encapsulamento da antralina.

As suspensões foram armazenadas a temperatura ambiente por um período de 15 dias e algumas modificações das características iniciais foram observadas. As nanocápsulas contendo somente o óleo de borragem (NC_{OB}) não apresentaram alterações quanto ao tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta ($p > 0,05$). Já as suspensões contendo o fármaco nanoencapsulado (NC_{OB-DB}) demonstraram diminuição no tamanho de partículas e PDI ($p < 0,05$) em relação aos valores iniciais, porém, manteve-se a homogeneidade do sistema; o potencial zeta diminuiu significativamente ($p < 0,05$). O teor de fármaco manteve-se próximo

ao teórico, indicando a estabilidade do fármaco no sistema. O pH das nanoestruturas (NC_{OB} e NC_{OB}-DB) diminuiu durante o período de armazenamento, o que pode ser explicado pelo relaxamento ou hidrólise das cadeias poliméricas (CALVO et al., 1996; SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2007) ou hidrólise dos ácidos graxos presentes no óleo, uma vez que esta diminuição foi observada para as nanocápsulas com e sem o fármaco.

O estudo de fotodegradação foi realizado para observar a estabilidade do dipropionato de betametasona após a sua nanoencapsulação e em solução frente à luz artificial UVC, expondo as amostras por um período de 10 h. O resultado obtido foi satisfatório, uma vez que as nanocápsulas foram capazes de proteger o fármaco da radiação UVC, tendo em vista a presença do polímero (PCL), o qual possui características de refletir e espalhar a radiação ultravioleta (JIMÉNEZ et al., 2004). Esse resultado corrobora com trabalhos já realizados, os quais demonstram a eficácia da parede polimérica em proteger o fármaco. Almeida e colaboradores (2009) demonstraram que nanocápsulas contendo benzofenona-3 foram capazes de proteger a substância ativa da luz UV quando comparadas à solução metanólica da mesma. No mesmo ano, Fontana e colaboradores (2009) evidenciaram que as nanopartículas foram capazes de reduzir a degradação do propionato de clobetasol, quando comparadas a solução capilar comercial e com a solução etanólica do fármaco.

Cabe salientar que através do método analítico utilizado nesse trabalho não foi possível evidenciar a presença de possíveis produtos de degradação. Entretanto, a literatura reporta a identificação de um produto de degradação do dipropionato de betametasona, o dipropionato de lumi-betametasona, após o estudo de fotoindução do fármaco em solução. Ainda, os autores inferem que a formação desse produto é devido às modificações no anel-A da molécula do fármaco (Lin et al., 2009).

A partir da degradação do fármaco pode-se verificar a ordem e a cinética de degradação. A solução e a suspensão de nanocápsulas contendo o dipropionato de betametasona apresentaram cinética de primeira ordem, a qual tem a velocidade de reação dependente da concentração do fármaco. Obtida a ordem de reação, a constante de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foram calculados, e os resultados confirmaram a capacidade das nanocápsulas em aumentar a estabilidade da substância, uma vez que um aumento de 4,8 vezes no $t_{1/2}$ foi verificado para o fármaco associado ao nanocarreador. Almeida e colaboradores (2010) demonstraram um aumento de 5,3 vezes na fotoestabilidade da rotina associada à nanocápsulas poliméricas.

Outra vantagem das nanopartículas é a capacidade de modificar o controle de liberação da substância ativa. Para avaliar esse parâmetro utilizou-se a técnica de difusão em

sacos de diálise e uma solução do fármaco (não associado) foi utilizada a fim de comparação. A partir dos resultados evidenciou-se que as nanocápsulas de núcleo lipidico foram capazes de modificar a liberação do dipropionato de betametasona após duas horas de experimento. A modelagem matemática foi realizada e verificou-se que ambas as amostras seguem uma liberação de primeira ordem (monoexponencial). Esse modelo indica que não há uma liberação inicial ou efeito *burst*, assim, a liberação ocorre em um só estágio. Através do tempo de meia-vida observou-se que as nanocápsulas mantiveram uma liberação mais lenta em relação à solução do fármaco livre. O mecanismo de liberação também foi avaliado, empregando a lei das Potências, que estabelece valores limites para o expoente de liberação. O resultado indicou que as nanocápsulas possuem um transporte anômalo ($n=0,67$), o que designa que a liberação do fármaco é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas, seguido da difusão do dipropionato de betametasona.

Dando continuidade aos estudos, as nanocápsulas foram incorporadas em hidrogéis e dois tipos de polímeros formadores de gel foram empregados: Carbopol[®] Ultrez e Cellosize[®]. O Carbopol[®] Ultrez é um polímero sintético hidrofílico, de caráter aniônico, pertencente à classe dos carbômeros. Sua utilização deve-se a facilidade de dispersão do polímero por intumescimento em meio aquoso, alta viscosidade em baixas concentrações, grande intervalo de viscosidade, além de seu alto peso molecular não permitir penetração na pele (TAMBURIC & CRAIG, 1995; HOSMANI, 2010). A hidroxietilcelulose (Cellosize[®]) constitui um polímero semissintético, de caráter não-iônico, o qual produz formulações com grande variedade de viscosidade, não sofre influência de íons presentes nos sistemas incorporados e é compatível com pH ácido.

Os hidrogéis foram caracterizados em relação as suas propriedades físico-químicas. Do ponto de vista macroscópico, as formulações apresentaram coloração branca e odor característico de seus componentes; em relação ao aspecto, as preparações contendo Carbopol[®] mostraram-se homogêneas, enquanto as contendo hidroxietilcelulose apresentaram aspecto aerado.

Em relação ao pH, os hidrogéis apresentaram valores compatíveis com a aplicação tópica e se verificou que os hidrogéis não sofreram influência no pH quando as nanocápsulas foram incorporadas ($p>0,05$). Este resultado vem de encontro a outros trabalhos, conforme demonstrado por Marchiori e colaboradores (2010), os quais desenvolveram hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de dexamentasona e observaram que o pH não foi influenciado pela incorporação das nanocápsulas. Resultados semelhantes foram obtidos na preparação de hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de propionato de

clobetasol (FONTANA et al., 2011), hidrogéis de Natrosol[®] contendo nanopartículas lipídicas de resveratrol (NEMEN & LEMOS-SENNA, 2011) e hidrogéis de Aristoflex[®] contendo nanocápsulas de tioconazol (HARTER, 2013).

Para verificar a presença das nanoestruturas, os hidrogéis foram avaliados em relação ao diâmetro médio de partículas. Para tal, uma alíquota de cada formulação foi diluída em água, na mesma proporção utilizada na avaliação das suspensões aquosas. A partir dos resultados, pode-se verificar que o tamanho médio das partículas das nanocápsulas foi mantido após a inclusão na preparação semissólida. Para comparação, a análise foi, também, realizada para os hidrogéis contendo o fármaco não associado e os valores obtidos foram 480 ± 6 nm e 257 ± 4 nm para G1-DB e G2-DB, respectivamente, evidenciando que os tamanhos obtidos para os hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados foram provenientes das nanocápsulas poliméricas.

Para quantificação do fármaco nos hidrogéis o método analítico foi validado e mostrou-se linear, específico e preciso. A exatidão foi inferida, tendo em vista os resultados obtidos na validação do método para as suspensões aquosas. Sendo assim, o teor de betametasona foi determinado e os valores encontrados foram próximos aos teóricos (0,5 mg/g).

No que se refere à espalhabilidade, o hidrogel preparado com Cellosize[®] apresentou maior fator de espalhabilidade, comparado ao hidrogel de Carbopol[®] Ultrez, abrangendo uma maior área de aplicação. A incorporação das nanocápsulas diminuiu o fator de espalhabilidade, o que pode estar relacionado com a presença do polímero (PCL) nas mesmas. Neste caso, este decréscimo pode ser vantajoso, devido à área limitada de tratamento das dermatites ou outras doenças cutâneas. Resultado semelhante foi verificado por Marchiori e colaboradores (2010) na avaliação da espalhabilidade de hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez contendo nanocápsulas de dexametasona.

Em relação à análise reológica, os hidrogéis contendo as nanocápsulas apresentaram comportamento de fluxo pseudoplástico, adequando-se ao modelo de Herschel-Bulkley ($r > 0,98$; $n < 1$), indicando uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003).

Além do estudo de caracterização dos hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas, um estudo *in vitro* de liberação foi realizado, no intuito de verificar a influência do nanoencapsulamento nas concentrações de fármaco liberadas em função do tempo, utilizando o método de células de difusão verticais do tipo Franz e membrana de diálise como barreira à liberação. A partir dos resultados verificou-se que as nanocápsulas de núcleo

lipídico foram capazes de modificar o controle de liberação de fármaco, o que é confirmado pelos valores das constantes de velocidade que foram menores ($p < 0,05$) para os hidrogéis contendo as nanocápsulas comparadas aos seus respectivos hidrogéis de fármaco livre. O tipo de polímero não influenciou no controle de liberação ($p > 0,05$).

A fim de avaliar a eficácia dos hidrogéis desenvolvidos, o ensaio *in vivo* de indução de tecido granulomatoso foi realizado. A partir dos resultados foi possível verificar a capacidade de inibição da formação de granuloma pelos hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas em comparação com as formulações placebo (hidrogéis base). Além disso, diferenças no percentual de inibição não foram verificadas para os hidrogéis contendo as nanocápsulas (G1-NC_{OB}-DB e G2-NC_{OB}-DB) e os contendo o fármaco não associado (G1-DB e G2-DB) ($p > 0,05$).

Por fim, o conjunto de resultados obtidos neste trabalho evidencia a possibilidade do uso do óleo de borragem como agente anti-inflamatório, além de sua utilização como núcleo oleoso em nanocápsulas. A inclusão dos sistemas nanoestruturados a hidrogéis foi satisfatória, sendo uma alternativa viável para o tratamento de doenças cutâneas. Como perspectivas de continuidade aos estudos, a avaliação da permeação *in vivo* e um ensaio *in vivo* para dermatite atópica seriam importantes.

CONCLUSÕES

- O creme-gel contendo o óleo de borragem desenvolvido neste trabalho apresentou características satisfatórias quanto ao pH, espalhabilidade e propriedades reológicas. Além disso, mostrou-se capaz de inibir a formação de granuloma, confirmando sua capacidade anti-inflamatória após aplicação tópica.
- As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o óleo de borragem e a associação de dipropionato de betametasona apresentaram características aceitáveis (tamanho nanométrico de partículas, baixo índice de polidispersão e potencial zeta negativo).
- A nanoencapsulação do dipropionato de betametasona proporcionou aumentar a sua fotoestabilidade frente à luz UVC.
- O estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir das suspensões coloidais confirmou que o polímero é capaz de modificar a liberação do dipropionato de betametasona.
- Hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez e Cellosize[®] contendo as nanocápsulas foram preparados, os quais apresentaram pH adequado para aplicação tópica e comportamento de fluxo pseudoplástico. O estudo de liberação *in vitro* a partir dos hidrogéis possibilitou evidenciar que as nanocápsulas foram capazes de diminuir a velocidade de liberação do dipropionato de betametasona e diferenças entre os polímeros formadores de géis utilizados não foram verificadas.
- O ensaio *in vivo* para a avaliação da atividade anti-inflamatória evidenciou a eficácia dos hidrogéis contendo os nanocarreadores, os quais foram capazes de inibir a formação de tecido granulomatoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PAESE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 28, n 2, p 165-172, 2009.

ALMEIDA, J.S.; BENVENÚ, D.M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C; CORADINI, K.; DE CARVALHO, L.M.; BÜRGER, M.E.; BECK, R.C. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n.7, p. 792-799, 2012.

ALVAREZ, A.M.R.; RODRÍGUEZ, M.L.G. Lípidos em preparações farmacêuticas e cosméticas. **Grasas y aceites**, v 51, n 1-2, p 74-96, 2000.

ALVAREZ-ROMÁN et al. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics na Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.

ANDRADE, D. F. ; FONTANA, M. C. ; BECK, R. C. R. . Evaluation of Three Synthetic Membranes as Limiting Barrier for in vitro Drug Release Studies from Hydrogels Containing Polymeric Nanocapsules. **Current Nanoscience**, v. 10, p. 367-373, 2014.

ANDREASSI, M.; FORLEO, P.; DI LORIO, A.; MASCI, S.; ABATE, G.; AMERIO, P. Efficacy of Á-linolenic acid in the treatment of patients with atopic dermatitis. **Journao of International Medical Research**, v 25, p 266–274, 1997.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design 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, 2003.

AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Trad George G. Ortega [et al.] 2 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.

AZULAY, R. D. **Dermatologia** – 5.ed., rev. e atual. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BARRE, D.E. Potential of Evening Primrose, Borage, Black Currant, and Fungal Oils in Human Health. **Annais of Nutrition Metabolism**, v 45, p 47–57, 2001.

BARZEGAR, C.; PRADALIER A. Therapeutic approach to atopic dermatitis. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v 42, p 410-424, 2002.

BASTOS, L.F.S.; MERLO, L.A.; ROCHA, L.T.S.; COELHO, M.M. Characterization antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v 55, p 349-356, 2007.

BATHEJA, P. et al. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 159–167, 2011.

BECK et al. Nanoparticles containing dexamethasone: Physicochemical properties and anti-inflammatory activity. **Acta Farm. Bonaerense**, v 22, n 1, p 11-5, 2003.

BERNARDI et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology** v 586, p 24–34, 2008.

BORGHETTI, G.S. & KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Rev. Bras. Cien. Farma.** 42(4): p. 531-537, 2006.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v 280, p 241–25, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. V. 1, 52p.

BROSCHÉ, T.; PLATT, D. Effect of borage oil consumption on fatty acid metabolism, transepidermal water loss and skin parameters in elderly people. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v 30, p 139-150, 2000.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, 530-536, 1996.

CARRASCOSA, J.M.; VANACLOCHAB, F.; BORREGOC, L.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, E.; FUERTESE, A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ-FREIRE, L.; ZULAICAG, A.; TUNEUH, A.; CABALLÉI, G.; COLOMÉI, E.; BORDASJ, X.; HERNANZK, J.M.; BRUFAU, C.; HERRERAM, E. Revisión actualizada del tratamiento tópico de la psoriasis. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v 100, p 190-200, 2009.

CASTRO, A. P. M.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; GRUMACH, A.S. Ácidos Graxos na Dermatite Atópica: Etiopatogenia e Terapêutica. **Pediatria**, v 17, n 2, p 79-85, 1995.

CASTRO et al. Guia Prático para o Manejo da Dermatite Atópica – opinião conjunta de especialistas em alergologia da Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v 29, n 6, p 268-282, 2006.

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.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v 250, p 273-281, 2003.

CHOI, M.J.; RUKTANONCHAI, U.; SOOTTITANTAWAT, A.; MIN, S.G. Morphological characterization of encapsulated fish oil with b-cyclodextrin and polycaprolactone. **Food Research International**, v 42, p 989-997, 2009.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R.D. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v 116, p 144–151, 2008.

CONTRI, R. et al. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2398–2406, 2011.

CUNHA, A.P., SIVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. *Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DEVADASU, R.V.; WADSWORTH, R.M.; KUMAR, M.N.V.R. Tissue localization of nanoparticles is altered due to hypoxia resulting in poor efficacy of curcumin nanoparticles in pulmonary hypertension. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v 80, p 578–584, 2012.

ENGLER M.M. Comparative study of diets enriched with evening primrose, black currant, borage or fungal oils on blood pressure and pressor responses in spontaneously hypertensive rats. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v 49, p 809–814, 1993.

ENGLER, M.M.; ENGLER, M.B. The effects of dietary evening primrose, black currant, borage and fungal oils on plasma, hepatic and vascular tissue fatty acid Composition in the spontaneously hypertensive rat. **Nutrition Research**, v 18, n 9, p 1533-1544, 1998.

ESMAEILI, A.; SAREMNIA, B.; KOOHIAN, A.; REZAZADEH, S. Mechanism of nanocapsules of *Matricaria recutita* L. extract formation by the emulsion-diffusion process. **Superlattices and Microstructures**, v 50, p 340–349, 2011.

FARMACOPÉIA BRITÂNICA, v.2, London, 2010.

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

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing as essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

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 nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254–263, 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. **European Journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FOSTER, R. H et al. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. **Nutrition**, v 26, p 708-718, 2010.

FREITAS, S.; HIELSCHER, G.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification—a useful tool for pharmaceutical development and production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v 3, n 1, p 76–85, 2006.

FRIEDRICH, M.; PRIMO, F.T.; FUNCK, J.A.B. *et al.* Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no formulário nacional. *Acta Farm. Bonaer.* 26(4): 558-562, 2007.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v 31, p 1131-1136, 2008.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A.K. Spreading of Semisolid Formulations. **Pharmaceutical Technology**, p.84-105, 2002.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F.T.M-C.; VERRI, W.A.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics** v 64, p 99–106, 2006.

GILLET, A.; COMPÈRE, P.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; DUCAT, E.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v 411, p 223–231, 2011.

GILANI, A.H.; BASHIR, S.; KHAN, A.-U. Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v 114, p 393–399, 2007.

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

HAFID, R.E.; BLADE, S.F.; HOYANO, Y. Seeding date and nitrogen fertilization effects on the performance of borage (*Borago officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v 16, p 193-199, 2002.

HARTER, A. Desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HENZ, B.M.; JABLONSKA, S.; VAN DE KERKHOF, P.C.M.; STINGL, G.; BLASCYK, M.; VANDERVALK, P.G.M.; MUGGLI, R.; RAEDERSTORFF, D. Doubleblind, multicentre analysis of the efficacy of borage oil in patients with atopic eczema. **Brazilian Journal Dermatology**, v 140, p 685–688, 1999.

HERRMANN, M.; JOPPE, H.; SCHMAUS, G. Thesinine-40-O-b-d-glucoside the first glycosylated plant pyrrolizidine alkaloid from *Borago officinalis*. **Phytochemistry**, v 60, p 399–402, 2002.

HORROBIN, D.F. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. **American Journal Clinical Nutrition**, v 71, n 1, p 367S – 72S, 2000.

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

HOW, C. W.; RASEDEE, A.; ABBASALIPOURKABIR, R. Characterization and Cytotoxicity of Nanostructured Lipid Carriers Formulated With Olive Oil, Hydrogenated Palm Oil, and Polysorbate 80. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 12, n. 2, p. 72-78, 2013.

HUYNH, N.T. et al. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 201–209, 2009.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v 87, p 581-586, 2004.

JAGER, E.; VETURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMAN, 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.

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

KHOEE, S.; HOSSAINZADEH, M.T. Effect of O/S/W process parameters on 17 β -EV loaded nanoparticles properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v 75, n 1, p133–140, 2010.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 2001.

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.

LANGER, T., FRANZ, C. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial samples of borage seed oil products by GC–MS. **Scientia Pharmaceutica**, v 65, p 321–328, 1997.

LE BARS, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. **Pharmacology** v 53, p 597-652, 2001.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M.D.; NOMURA, I.; HAMID, Q.A. New insights into atopic dermatitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v 113, n 5, p 651 – 657, 2004.

LIN, M.; LI, M; BUEVICH, A.V.; OSTERMAN, R.; RUSTUM, A.M. Rapid structure elucidation of drug degradation products using mechanism-based stress studies in conjunction with LC–MSⁿ and NMR spectroscopy: identification of a photodegradation product of betamethasone dipropionato. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 50, p 275–280, 2009.

LINNAMAA, P.; SAVOLAINEN, J.; KOULU, L.; TUOMASJUKKA, S.; KALLIO, H.; YANG, B.; VAHLBERG, T.; TAHVONEN, R. Blackcurrant seed oil for prevention of atopic dermatitis in newborns: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical & Experimental Allergy**, v 40, p 1247–1255, 2010.

LIPOZENCIC, J.; LJUBOJEVIC, S. Dermatite Atópica. In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

LU, Y.; FOO, L. Y. Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. **Food Chemistry**, v 80, p 71-76, 2003.

MAMBRO, V.M.D.; BORIN, M.F.; FONSECA, M.J.V. Topical formulations with superoxide dismutase: influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 97, 2003.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, 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: preparation, characterization, and in vitro drug releas

MILÃO, D. Desenvolvimento Tecnológico e avaliação biológica de formar farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. Dissertação de Mestrado –Programa de pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre.Brasil. 2001

MISHRA et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9–24, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010. NUDELMAN, 1975;

OCHAITA, L.; FERNANDÉZ, S. *Actualización em el tratamiento de la psoriasis*. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud**, Madrid, v. 25, n. 4, p. 105-110. 2001. Disponível em: http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/psoriasis25_4.pdf. Acesso em: 29 nov 2013.

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

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, 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**, 5, 240-246, 2009.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

RIBEIRO, M.A.; ESQUÍVEL, M.M.; BERNARDO GIL, M.G. A extração supercrítica e os antioxidantes naturais. **Ingenium**, p. 141-143, 2007.

RIGO, L.A, RASCOVETZKI, R. H., BECK, R. C. R. Sunscreen formulations containing rice bran or soybean oil: Rheological properties, spreadability and in vitro Sun Protection Factor. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.2, p. 246-252, 2011.

RIGO, L.A.; WEBER, J.; SILVA, C.B.; BECK, R.C.R. Evaluation of the Spreadability of Pharmaceutical or Cosmetic Semisolid Formulations Using Scanned Images. **Latin American Journal of Pharmacy**. 31 (10): 1387-91 (2012)

SAHOO, S.K.; PARVEN, M.S.; PANDA, M.S. The present and future of technology in human health care. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v 3, p 20-31, 2007.

SANTOS et al. In: RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia** – Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATIAZZI, J.; ADAMS, A.I.H.; DENARDI, L.; ALVES, S.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C** v 33, p 1389–1394, 2013.

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

SAVIAN, A.L. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ditranol e sua incorporação em formulação semissólida de base aquosa. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHAFFAZICK, R. S. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 21, n 2, p 99-106, 2002.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64–71, 2008.

SHOU, M.; GALINADA, W.A.; WEI, Y.-C.; TANG, Q.; MARKOVICH, R.J.; RUSTUM, A.M. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion®. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 50, p 356–361, 2009.

SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZPA, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plants oils. **Journal of Food Lipids**, v 15, p 137-149, 2007.

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

SOTO, C.; CONCHA, J.; ZUNIGA, M.E. Antioxidant content of oil and defatted meal obtained from borage seeds by an enzymatic-aided cold pressing process. **Process Biochemistry**, v 43, p 696–699, 2008.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v 26, n 5, 2009.

WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octylmethoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet Aradiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v 4, p 80-89, 2008.

WRIGHT, S. Essential fatty acids and the skin. **Brazilian Journal Dermatology**, v 125, n 6, p 503–15, 1991.

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E.S.; BARRAT, G.; FESSI, J.P.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v 89, p 139–146, 1993.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; OLIVEIRA, C.M; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI. A.M.O.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.;FORCELINI, C.M.; BECK, R.C.R.; MOREIRA, J.C.F. Curcumin-loaded lipid-core

nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v83, p 156–167, 2013.

ZIBOH, V.A.; MILLER, C.C.; CHO, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 71, v 1, p 361S–6S, 2000.

ZULFAKAR, M.H.; ABDELOUAHAB, N.; HEARD, C.M. Enhanced topical delivery and ex vivo anti-inflammatory activity from a betamethasone dipropionate formulation containing fish oil. **Inflammation Research**, v 59, p 23-30, 2010.