

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

**DESENVOLVIMENTO DE GÉIS-CREME A PARTIR
DO PRODUTO LIOFILIZADO CONTENDO
NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE BORRAGEM
E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maiara Taís Bazana

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**DESENVOLVIMENTO DE GÉIS-CREME A PARTIR DO
PRODUTO LIOFILIZADO CONTENDO NANOCÁPSULAS
DE ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO
DE BETAMETASONA**

Maiara Taís Bazana

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: Prof^ª Dr^ª Cristiane de Bona da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bazana, Maiara Taís
Desenvolvimento de géis-creme a partir do produto liofilizado contendo nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona. / Maiara Taís Bazana.-2015.
145 p.; 30cm

Orientadora: Cristiane de Bona da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. E-ADA 2. E-NTPDase 3. Liberação 4. Perfil oxidativo 5. Permeação/penetração cutânea I. Silva, Cristiane de Bona da II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Maiara Taís Bazana. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: maiarabazana@gmail.com

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

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

**DESENVOLVIMENTO DE GÉIS-CREME A PARTIR DO PRODUTO
LIOFILIZADO CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE
BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA**

elaborada por
Maiara Taís Bazana

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Ana Luiza Maurer da Silva, Dra. (UNISINOS)

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

*Dedico esta realização aos meus pais e ao Felipe,
por todo amor, carinho, compreensão e por
sempre acreditarem que eu chegaria até aqui*

*"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!"
(Mahatma Gandhi)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade de estar nesse plano buscando minha evolução e por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar os obstáculos e mostrar o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais, Isabel e Orlando por todo apoio, incentivo para que eu sempre estudasse, amor, carinho, pelas palavras acolhedoras, que apesar da distância e muita saudade sempre se fizeram presentes, torcendo para que desse tudo certo.

Ao Felipe, meu namorado, amigo e companheiro de todas as horas, que não mede esforços para me ver feliz e me acompanhou nessa caminhada, ouviu meus desabafos e me deu muita força para superar as dificuldades.

À minha orientadora, Prof^a. Cris por todos esses anos de orientação, desde a iniciação científica, principalmente por ter confiado e acreditado em mim, bem como, todos os ensinamentos e por ser um exemplo de profissional.

À Rose, essa funcionária que esteve sempre presente com sua alegria e disposição, que foi como uma mãe para mim, me recebendo com um abraço amigo todos os dias, me aconselhando e motivando, e também pelos momentos de risadas e chimarrão, sendo essencial para a minha caminhada.

À minha amiga e colega Lu, que desde a faculdade e agora no mestrado acompanhou minha trajetória, pelos momentos compartilhados, pela amizade, por sempre ajudar e pela troca de experiências.

À IC, Aline Silveira, por todo auxílio, disposta a madrugar ou anoitecer no lab comigo, demonstrando cuidado e agilidade nas suas atividades. Além disso, pela amizade, confiança e apoio que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às gurias do Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico (Fê, Ju, Tati, Mari, Thami, Robertinha, Jéssica, Grazi, Watussi, Raquel, Nadine, Sílvia, Lara, Aline, Taísa e Cris Codevilla) pela amizade, trocas de conhecimento e experiência, ajuda (principalmente com a limpeza da pele de porco), conversas, momentos de descontração, rodas de mate, enfim pelo convívio diário. Também, agradeço à Ju, Fê e Mari pelas análises realizadas no Zetasizer e Mastersizer.

Aos amigos, afilhados e agora compadres Andressa e Guilherme, pelo incentivo, discussões bioquímicas e experiências passadas. Graças ao *WhatsApp* podemos descontrair,

falar do Cartola e compartilhar vídeos e fotos (ultimamente, em especial as da Helena), tornando os dias mais leves e amenizando a pressão.

Aos demais amigos e familiares que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes, torcendo e me apoiando.

À Prof^a. Daniela B. Rosa Leal e seus orientados, principalmente ao Guilherme pela ajuda na indução, tratamento das ratas e demais experimentos, ao Jader, João e Pedro pelo auxílio na realização do ensaio *in vivo*.

À Prof^a. Nara M. Beck Martins pelo auxílio nas análises histológicas.

Aos técnicos e funcionários da UFSM, em especial, a Rafa por ser muito prestativa e dedicada quando precisei usar o liofilizador.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos transmitidos.

À Capes, órgão financiador da Bolsa de estudos.

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

À Universidade Federal de Santa Maria por todas as oportunidades oferecidas.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE GÉIS-CREME A PARTIR DO PRODUTO LIOFILIZADO CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE BORRAGEM E DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

AUTORA: MAIARA TAÍS BAZANA

ORIENTADORA: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

Entre as doenças de pele, a dermatite atópica se caracteriza como inflamatória crônica, sendo os corticosteroides amplamente utilizados, entre eles o dipropionato de betametasona. Aliado a isso, o óleo de semente de *Borago officinalis* L. possui ácidos graxos importantes na estrutura e função da pele. Ainda, com o uso da nanotecnologia é possível melhorar algumas propriedades de substâncias, desenvolvendo terapias inovadoras e eficazes. Nesse sentido, este trabalho objetivou desenvolver géis-creme a partir do produto liofilizado de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o óleo de *Borago officinalis* L (óleo de borragem) associado ou não com o fármaco dipropionato de betametasona, visando sua aplicação no tratamento de doenças inflamatórias da pele. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição de polímero pré-formado e, após, caracterização, desidratadas por liofilização. Os produtos secos foram avaliados em relação ao rendimento ponderal, tamanho médio de partículas após redispersão em água, distribuição de tamanho de partícula, teor de fármaco, índice de ressuspensão, análise morfológica e liberação *in vitro* do fármaco. Além disso, a preparação e a caracterização dos géis-creme foram, também, realizadas, seguido de um estudo de permeação *in vitro* do fármaco a partir das formulações semissólidas e a avaliação da eficácia em modelo experimental de dermatite de contato. As suspensões apresentaram tamanho de partícula nanométrico (185-210 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,10, pH levemente ácido (6,0-6,5), ausência de nanocristais e distribuição do fármaco no núcleo. O teor de fármaco foi de $0,25 \pm 0,01$ mg/mL de betametasona e a eficiência de encapsulamento foi de, aproximadamente, 100%. Em relação à liofilização, os produtos desidratados mostraram tamanho de partícula na escala nanométrica (190-250 nm), polidispersão abaixo de 0,35; índice de ressuspensão próximo à unidade, rendimento em torno de 93% e concentração de betametasona próximo ao valor teórico. O perfil de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas e dos produtos redispersos apresentou controle da liberação e modelo monoexponencial. Os géis-creme apresentaram valores de pH entre 6,0 e 6,5 e teor de fármaco próximo ao teórico (0,5 mg/g). Os reogramas exibiram comportamento de fluxo não Newtoniano, seguindo o modelo de Herschel-Bulkley. O teste *in vitro* de permeação/penetração indicou que o dipropionato de betametasona é capaz de atingir as diferentes camadas da pele; no entanto, o gel-creme com fármaco não associado foi detectado no meio receptor. Em relação à eficácia *in vivo*, o modelo de dermatite de contato foi capaz de causar dano tecidual, com alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico. Entre os diferentes tratamentos, os géis-creme contendo o óleo de borragem e o dipropionato de betametasona nanoestruturados com tratamento alternado foram os que apresentaram melhor eficácia dermatológica, imunológica e redução do dano oxidativo nos tecidos avaliados.

Palavras-chave: E-ADA. E-NTPDase. Liberação. Perfil oxidativo. Permeação/penetração cutânea.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT OF THE CREAM GELS FROM LYOPHILIZED PRODUCT CONTAINING BORAGE OIL AND BETAMETHASONE DIPROPIONATE NANOCAPSULES

AUTHOR: MAIARA TAÍS BAZANA

ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Place and Date of Defense: Santa Maria, August 21, 2015.

Among skin diseases, atopic dermatitis is characterized as a chronic inflammatory, it is widely used corticosteroids, including betamethasone dipropionate. Allied to this, *Borago officinalis* L. seed oil has fatty acids important in the structure and function of the skin. Thus, with the use of nanotechnology and lyophilization it is possible to improve some properties of substances and developing innovative effective therapies. Therefore, this study aimed to develop cream gels from the lyophilized product of lipid-core nanocapsules suspensions containing the oil of the *Borago officinalis* L. (borage oil) associated or not with betamethasone dipropionate drug, for their application in the treatment inflammatory skin diseases. The nanocapsules suspension were prepared by the interfacial of the preformed polymer method, and after characterization, dehydrated by lyophilization. Dehydrated products were evaluated relative to the yield, mean particle size after redispersion in water, the particle size distribution, drug content, resuspension index, morphological analysis and *in vitro* drug release. Furthermore, the preparation and characterization of cream gels were made, followed by an *in vitro* drug permeation study based on semi-solid formulations and the evaluation of the efficacy in an experimental model of contact dermatitis. The suspensions showed nanometric particle size (185-210 nm) polydispersion index below 0.10, slightly acidic pH (6.0-6.5), absence of nanocrystals and distribution of the drug in the core. The drug content was 0.25 ± 0.01 mg mL⁻¹ betamethasone, and the encapsulation efficiency was approximately 100%. For lyophilization, the dehydrated products had particle size in the nanometer range (190-250 nm), polydispersity below 0.35, resuspension index close to unity, yield around 93% and the concentration of betamethasone close to theoretical. The release profile of betamethasone dipropionate from nanocapsules and redispersed products presented control the release and monoexponential model. The cream gels presented pH (6.0-6.5) and drug content close to the theoretical (0.5 mg / g). Rheograms exhibited non-Newtonian flow behavior, following the model of Herschel-Bulkley. *In vitro* skin permeation/penetration indicated that betamethasone dipropionate is capable of achieving the different skin layers, however, cream gels not associated with drug was detected in the receptor medium. For efficacy *in vivo*, contact dermatitis model was capable of causing tissue damage with changes in enzyme activities of the purinergic system. Among the different treatments, cream gels containing borage oil and betamethasone dipropionate nanostructures with alternating treatment showed the best dermatological efficacy, immunological and reduced oxidative damage in tissues evaluated.

Keywords: Drug release. E-ADA. E-NTPDase. Oxidative profile. Skin permeation/penetration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Estrutura química do dipropionato de betametasona.....38

CAPÍTULO 1: Betamethasone-loaded lipid-core nanocapsules and its lyophilized product: characterization and release study

Figure 1 - Graphical representation of particle size average and polydispersity index (PDI) of the BD-loaded lipid-core nanocapsules storage during 30 days, at room temperature 60

Figure 2 - Graphical representation of the BD loaded lipid-core nanocapsules zeta potential during 30 days storage, at room temperature 60

Figure 3 - Rheogram of lipid-core nanocapsules (A) BD-NCOB e (B) NCOB..... 61

Figure 4 - Images SEM obtained from lyophilized powders (increase of 5000X - bar corresponds to 5 µm). Trehalose (A), trehalose and BD physical mixture (B), L-BD-NCOB (C and D). 63

Figure 5 - Particle size distribution by laser diffraction of L-NCOB analyzed after 60 minutes of redispersion..... 64

Figure 6 - Particle size distribution by laser diffraction of L-BD-NCOB analyzed after 60 minutes of redispersion..... 64

Figure 7 - In vitro BD release profile from methanolic solution (BD-S), lipid-core nanocapsules (BD-NCOB) and resuspended powders (L-BD-NCOB) using dialysis bag method (n = 3) 65

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato

Figura 1 - Reograma dos géis-creme contendo produto seco das nanocápsulas de óleo de borragem (GCL-NCOB) e nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona (GCL-DB-NCOB), (n=3). 89

Figura 2 - Representação gráfica da espalhabilidade dos géis-creme contendo produto seco das nanocápsulas de óleo de borragem (GCL-NCOB) e nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona (GCL-DB-NCOB), (n=3) 90

Figura 3 - Distribuição da betametasona a partir do gel-creme contendo DB e OB não associados às nanocápsulas (GCOB-DB) e do gel-creme nanoestruturado (GCL-DB-NCOB) no estrato córneo (EC), epiderme (EP), derme (D) e no meio receptor, verificada no estudo de permeação/penetração cutânea com células de Franz, após 8 h..... 91

Figura 4 - Imagens histológicas das orelhas de ratas dos animais de diferentes grupos corados com hematoxilina e eosina. (A) grupo controle. (B) dermatite de contato. (C) Animais tratados com GCOB. (D) Animais tratados com GC-DBOB. (E) Animais tratados com GCL-DB-NCOB. (F) Animais tratados com GCL-DB-NCOB A. (G) Animais tratados com GCL-NCOB. (H) Animais tratados com GC. Setas: 1) camada córnea; 2) camada escamosa; 3) derme; 4) vaso sanguíneo; a) congestão vascular; b) edema na derme; c) linfócitos; d) espessamento da camada espinhosa; e) descamação do estrato córneo; f) discreta descamação do estrato córneo; g) redução do edema h) retificação da epiderme i) edema nas células da epiderme. Aumento de 200X..... 94

Figura 5 - Hidrólise do ADP e ATP pela E-NTPDase em linfócitos nos grupos C, grupo controle; DC dermatite de contato; GCOB, DC tratado com óleo livre; GC-DBOB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NCOB, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado; GCL-DB-NCOB A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GCL-NCOB, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. Amostras incubadas por 70 minutos a 37 °C. As barras representam à média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett's ($p < 0,05$) para letras diferentes ($n=5$). 96

Figura 6 - Atividade da ADA em linfócitos de ratas nos grupos C, controle; DC dermatite de contato; GC-OB, DC tratado com óleo livre; GC-OBDB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GC-NCOBDB, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-NCOBDB A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NCOB, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC-B, DC tratado com gel-creme base. As barras representam à média \pm EPM de U ADA/ mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett's ($p < 0,05$) para letras diferentes ($n=5$) 97

Figura 7 - Níveis de TBARS em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GCOB, DC tratado com óleo livre; GC-DBOB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NCOB, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-DB-NCOB A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NCOB, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média \pm EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ($p < 0,05$) para letras diferentes 100

Figura 8 - Níveis de grupos sulfidrilas não-proteicos em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GCOB, DC tratado com óleo livre; GCL-DBOB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NCOB, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-DB-NCOB A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NCOB, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média \pm EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ($p < 0,05$) para letras diferentes..... 100

Figura 9 - Níveis de catalase em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GCOB, DC tratado com óleo livre; GC-DBOB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NCOB, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-DB-NCOB A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GCL-NCOB, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média ± EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls (p<0,05) para letras diferentes..... 101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Formulações submetidas à liofilização.....46

CAPÍTULO 1: Betamethasone-loaded lipid-core nanocapsules and its lyophilized product: characterization and release study

Table 1 - Physicochemical characteristics of BD-loaded lipid-core nanocapsules containing borage oil (BD-NCOB – 0.25 mg mL⁻¹ of betamethasone) and lipid-core nanocapsules without the drug (NCOB).....58

Table 2 - Calculated parameters through the first order model of BD from methanolic solution (BD-S), lipid-core nanocapsules (BD-NCOB) and resuspended powders (L-BD-NCOB).....66

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa dos géis-creme utilizados na avaliação da eficácia in vivo em modelo de dermatite de contato.84

Tabela 2 - Características físico-químicas dos géis-creme contendo os produtos liofilizados a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas pela associação do DB e OB (média ± desvio padrão, n=3).....88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	35
3.1 Dermatite Atópica.....	35
3.2 Dipropionato de betametasona	37
3.3 Óleo de semente de <i>Borago officinalis L.</i>	39
3.4 Sistemas nanoestruturados.....	42
3.4.1 Considerações	42
3.4.2 Desidratação de nanopartículas	44
CAPÍTULO 1: Betamethasone-loaded lipid-core nanocapsules and its lyophilized product: characterization and release study	49
ABSTRACT	52
1 INTRODUCTION	53
2 MATERIAL AND METHODS.....	54
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	58
4 CONCLUSION	67
REFERENCES	67
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato	73
2.1 Apresentação	75
RESUMO	77
1 INTRODUÇÃO.....	78
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS	103
DISCUSSÃO GERAL	111
CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais externo do corpo humano e funciona como uma barreira que retém água no interior do corpo e impede a penetração de contaminantes externos. É composta por três camadas, as quais diferem em relação à composição e estrutura: epiderme, derme e hipoderme (BOLZINGER et al., 2012). A epiderme é a camada mais externa da pele e é separada da derme subjacente pela membrana basal. Os queratinócitos, que compõem a epiderme, proliferam dentro da camada de células basais e a medida que a diferenciação prossegue, progridem para cima através das diferentes camadas da epiderme (camada espinhosa, camada granular e camada córnea ou estrato córneo), tornando-se cada vez mais anucleados e compactados (SANDILANDS et al., 2009). Estudos recentes indicam que os defeitos na função da barreira epidérmica contribuem para o desencadeamento e perpetuação de inflamações na pele como a dermatite atópica (KUO et al., 2013; McALEER; IRVINE, 2013).

A dermatite atópica, também conhecida como eczema atópico ou eczema, é uma doença de pele caracterizada por coceira e inflamação com um espectro de fenótipo clínico (BIEBER, 2012; EICHENFIELD et al., 2014). A patologia da pele eczematosa é caracterizada por edema epidérmico intercelular e uma disfunção da barreira, resultando em um aumento na perda de água transcutânea e penetração de alérgenos externos e irritantes (BIEBER, 2008). Além disso, alguns pacientes com dermatite atópica apresentam maior susceptibilidade à infecção bacteriana e viral (COLE et al., 2014).

Em relação ao tratamento da dermatite atópica, deve-se ter cuidado com a pele, identificação e eliminação dos fatores de exacerbação e o uso de fármacos com propriedades anti-inflamatórias. Para a prevenção é importante 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 utilizados (LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010).

Os corticoides tópicos são fármacos muito usados no tratamento de patologias inflamatórias, proliferativas ou de causa imunológica da pele. Entre os utilizados está a betametasona e seus derivados (COSTA, MACHADO; SELORES, 2005). O dipropionato de betametasona possui ação anti-inflamatória, vasoconstritora, antiproliferativa e imunossupressora, sendo empregado no tratamento de doenças de pele. Entretanto, assim

como os demais corticosteroides, pode causar efeitos colaterais locais e sistêmicos, relacionados à potência do fármaco, pois quanto mais potente, maior será a eficácia terapêutica, bem como a incidência desses efeitos indesejados (ROCHA; HORTA; SELORES, 2004).

A busca pelo emprego de óleos de origem vegetal em preparações farmacêuticas e cosméticas deve-se às propriedades emolientes, hidratantes, lubrificantes e, em alguns casos, aos efeitos terapêuticos (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000). Os óleos e seus produtos ricos em ácido linoleico (ômega-6) auxiliam na função da barreira cutânea da pele e influenciam na resposta inflamatória, como o óleo de borragem (BROSCHÉ; PLATT, 2000; FOSTER et al., 2010).

O óleo de borragem, obtido da semente do *Borago officinalis L.*, é conhecido por apresentar propriedades anti-inflamatória (FOSTER, et al., 2010), antiespasmódica, anti-hipertensiva, antitérmica, afrodisíaca, emoliente, diurética e, também, é considerado útil para o tratamento de asma, bronquite, cólicas, diarreia, palpitações e doenças renais (GILANI; BASHIR; KHAN, 2007).

Os óleos vegetais também são utilizados no desenvolvimento de nanocarreadores para aplicação tópica, conforme demonstrado por alguns autores (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; FRIEDRICH et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; WEBER et al., 2015). Destacam-se como vantagens destes sistemas, 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 sua toxicidade, prevenindo ou reduzindo possíveis reações de sensibilidade. Isso ocorre devido o uso de concentrações menores e a diminuição do contato direto do fármaco com a região alvo (POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

No entanto, estes sistemas apresentam uma limitada estabilidade em meio aquoso, uma vez que, durante o armazenamento, podem ocorrer precipitação/degradação de componentes e perda da substância ativa encapsulada (MAGENHEIM; BENITA, 1991, BECK et al., 2012). Em função disto, técnicas que levem à desidratação das suspensões nanoestruturadas têm sido estudadas e desenvolvidas, tais como a secagem por aspersão (MÜLLER et al., 2000) e a liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003b; YANG et al., 2013).

Considerando o exposto, o presente trabalho objetivou desenvolver formulações semissólidas do tipo gel-creme, a partir de produtos secos redispersíveis, obtidos por liofilização, contendo nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas pela associação ou não do

óleo de borragem com dipropionato de betametasona. Somado a isso, avaliar as características físico-químicas, o perfil de liberação *in vitro* do fármaco, o estudo de permeação/penetração cutânea e a avaliação da eficácia em modelo experimental de dermatite de contato.

Cabe salientar que até o momento, não há estudos que utilizam a liofilização na desidratação de suspensões de nanocápsulas contendo o óleo de borragem e o dipropionato de betametasona, essas já desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa (WEBER et al., 2015), tão pouco a inclusão dos produtos secos em forma farmacêutica semissólida do tipo gel-creme, e estudos relacionados a caracterização físico-química, atividade anti-inflamatória e antioxidante, configurando o ineditismo do presente trabalho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver formulações semissólidas do tipo gel-creme a partir do produto liofilizado contendo nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas com o óleo de borragem e o dipropionato de betametasona, visando sua aplicação no tratamento de doenças inflamatórias da pele.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar nanocápsulas de núcleo lipídico contendo como núcleo oleoso o óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona;
- Avaliar as características físico-químicas das nanoestruturas quanto ao teor e eficiência de encapsulamento, diâmetro médio de partículas, polidispersão, potencial zeta, pH e viscosidade;
- Preparar produtos secos redispersíveis por liofilização das suspensões de nanocápsulas;
- Caracterizar os produtos secos mediante o rendimento, distribuição de tamanho, diâmetro médio de partículas, índice de ressuspensão em água, morfologia e teor de fármaco;
- Avaliar os perfis de liberação *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir das suspensões de nanocápsulas e dos produtos secos desenvolvidos, utilizando o método de saco de diálise;
- Preparar, caracterizar e avaliar as formulações semissólidas (gel-creme) contendo os produtos secos, com e sem o fármaco;

- Realizar estudo de permeação/penetração do fármaco a partir dos géis-creme empregando a pele de porco como barreira;
- Avaliar a eficácia das formulações semissólidas em modelo experimental de dermatite de contato e verificar a atividade da NTPDase e o perfil oxidativo.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dermatite Atópica

A dermatite atópica é uma doença de pele inflamatória crônica caracterizada por lesões pruriginosas (DENBY; BECK, 2012), pele seca e infecção por *Staphylococcus aureus* (BIEBER, 2008). O prurido recalcitrante é o sintoma mais desconfortável que os pacientes apresentam. Geralmente, é seguido por coceira, o que agrava a inflamação da pele e leva a uma sequência de condições denominado de “ciclo coceira-zero” (no inglês *itch-scratch cycle*) (MIHARA et. al., 2004). A doença é clinicamente definida e frequentemente associada com a rinite alérgica, asma e reações alimentares mediadas pela imunoglobulina E (IgE) (BIEBER, 2008; EYERICH; NOVAK, 2013; WOLLENBERG; FEICHTNER, 2013).

Além disso, a dermatite atópica acomete, principalmente, crianças em áreas urbanas ou em países desenvolvidos, e a prevalência tem aumentado ao longo das últimas três décadas, sendo que 15 a 30% das crianças e 2 a 10% dos adultos são acometidos em todo o mundo (WILLIAMS; FLOHR, 2006; THE MERCK MANUAL, 2013a). Esta doença, muitas vezes, está associada a asma e outras doenças alérgicas. A dermatite atópica, frequentemente, inicia na primeira infância (dermatite atópica precoce). Um total de 45% de todos os casos começam dentro dos primeiros seis meses de vida, 60% durante o primeiro ano e 85% antes dos cinco anos de idade. Mais de 50% das crianças que são afetadas nos primeiros dois anos de vida não tem qualquer sinal de sensibilização da IgE, mas tornam-se sensibilizados durante o curso da doença (ILLI et. al., 2004), e até 70% destas crianças têm uma remissão espontânea antes da adolescência. A doença também pode se manifestar em adultos (dermatite atópica de início tardio) e um número considerável de pacientes não apresenta sinal de sensibilização mediada por IgE (NOVAK; BIEBER, 2003).

O diagnóstico da dermatite atópica é essencialmente clínico e está baseado em uma variedade de sinais e sintomas, não havendo testes sorológicos específicos para o diagnóstico e mensuração de sua gravidade (YANG; JEON; PYUN, 2010). No entanto, a elevada variabilidade do fenótipo clínico e gravidade, antecedentes genéticos e mecanismos patológicos conhecidos sugerem um elevado grau de heterogeneidade fisiopatológico. Embora o padrão clínico de lesão seja relativamente uniforme, sendo de pele eczematosa, a

dermatite atópica, muitas vezes, apresenta padrões de progressão distintos, requerendo prevenção personalizada e estratégias de controle (BIEBER, 2012).

A fisiopatologia da dermatite atópica permanece incompletamente compreendida, embora as interações gene-ambiente desempenham um papel principal em indivíduos geneticamente predispostos (CORK et al., 2009; BARNES, 2010). Várias anormalidades imunológicas sistêmicas e cutâneas podem estar relacionadas à dermatite atópica, como o aumento de IgE sérica e a sensibilização a alérgenos, elevada expressão de citocinas tipo Th2 em lesões agudas, aumento do número de células T que expressam linfócitos cutâneos associado a antígeno e o aumento da expressão do receptor de IgE (FcεRI) nas células de Langerhans e nas células epidérmicas dendríticas inflamatórias, bem como a diminuição da expressão de peptídeos antimicrobianos (ONG et al., 2002; BOGUNIEWICZ; LEUNG, 2006). A dermatite atópica é, também, uma consequência da resposta imune tipo IV e, frequentemente, aparecem linfócitos T CD4+ infiltrados na pele (AZULAY, 2008; LIPOZENCIC; LJUBOJEVIC, 2010).

A deficiência em ácidos graxos essenciais (AGE), principalmente da série ômega 6 leva a condições inflamatórias da pele em animais e seres humanos. Ratos alimentados com uma dieta deficiente em AGE apresentaram a pele escamosa e avermelhada, bem como um aumento de até 10 vezes na perda transepidérmica de água. Os sintomas da deficiência de AGE em animais podem ser facilmente revertidos com a aplicação sistêmica ou tópica de AGEs, como o ácido linoleico, ácido γ -linolênico ou ácido columbínico. Em dermatite atópica não há deficiência de ácido linoleico, mas foi proposto que a conversão de ácido linoleico para o ácido γ -linolênico pode ser prejudicada (PROKSCH; FÖLSTER-HOLST; JENSEN, 2006). O uso de óleos ricos em AGE pode constituir uma alternativa, como exemplo o óleo de borragem, rico em ácido linoleico e γ -linolênico (FOSTER et al., 2010).

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 corticoesteroides são os fármacos mais utilizados, destacando-se: dipropionato de betametasona, fuorato de mometasona, desonida, dexametasona, hidrocortisona e dipropionato de clobetasol. (BOGUNIEWICZ, 2004; AZULAY, 2008; 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).

3.2 Dipropionato de betametasona

Os corticosteroides são fármacos altamente eficazes, sendo amplamente utilizados em dermatologia nas formas de creme, gel, solução e pomada para o tratamento de doenças inflamatórias da pele (SCHOEPE et al., 2006; ZÖLLER et al., 2008). Os estudos clínicos demonstraram que a utilização de corticosteroides, como o dipropionato de betametasona (DB) e o propionato de clobetasol, tem melhorado significativamente o tratamento de pacientes com dermatoses, tais como eczema e psoríase (MENTER et al., 2009; FELDMAN; YENTZER, 2009).

O dipropionato de betametasona é um agonista de receptores de glicocorticoides altamente potente que possui atividade anti-inflamatória, imunossupressora e antiproliferativa. Exerce sua ação através da inibição da fosfolipase A2, o que leva à inibição da síntese do ácido araquidônico e controla a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos (ALAM et al., 2012).

Os corticosteroides são classificados de acordo com sua potência, sendo classe I de altíssima potência, e classe VII os menos potentes. A potência depende de muitos fatores, incluindo as características do fármaco, a concentração e a base na qual ele é utilizado (AZULAY, 2008; THE MERCK MANUAL, 2013b). O dipropionato de betametasona em pomada (0,05%) encontra-se na classe II (alta potência), o creme pertence a classe III (média/alta potência), já a loção está classificada na classe V (média/baixa potência). As apresentações tópicas contendo hidrocortisona (precursora da classe), dexametasona, flumetasona, prednisolona e metilprednisolona pertencem a classe VII (baixíssima potência) (AZULAY, 2008).

O dipropionato de betametasona (Figura 1) é um éster derivado da betametasona, a qual sofreu modificações em sua estrutura a fim de melhorar a ação, minimizar efeitos secundários e proporcionar maior lipofilicidade (AZULAY, 2008). É praticamente insolúvel em água, solubilidade limitada em álcool e solúvel em acetona, clorofórmio e diclorometano; possui massa molecular de 504,6; log P de 3,66; pKa igual a 12,87. Comercialmente, é empregado em preparações semissólidas (cremes e pomadas) e loção na concentração de 0,64

mg/g (equivalente a 0,5 mg/g de betametasona) (DIPROSONE, 2014) e também como solução injetável na concentração de 6,43 mg/mL (equivalente a 5,0 mg/mL de betametasona) e 2,63 mg de fosfato dissódico de betametasona (equivalente a 2,0 mg/mL de betametasona), em veículo estéril (DIPROSPAN, 2006).

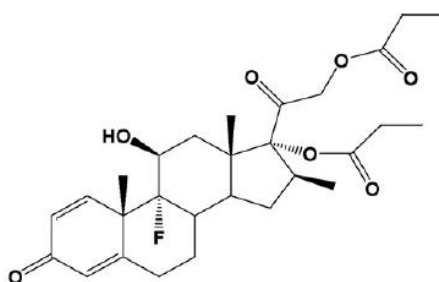


Figura 1. Estrutura química do dipropionato de betametasona.

Os principais efeitos colaterais relatados para o uso de corticosteroides tópicos compreendem: atrofia cutânea, dermatite da face, agravam ou mascaram infecções cutâneas, eczema de contato, hipopigmentação, hipertricose e efeitos oculares (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005). Devido às suas características e efeitos adversos, pode estar associado a outros fármacos (antifúngicos, analgésicos, antibióticos) ou a produtos naturais. Zulfakar e colaboradores (2010) demonstraram que o óleo de peixe, além de aumentar a liberação do dipropionato de betametasona na pele, contribuiu para a redução da inflamação, devido à produção de mediadores inflamatórios menos potentes e à inibição de enzimas inflamatórias da pele. Sendo assim, a associação desse óleo é vantajosa por propiciar uma diminuição da dose dos corticoesteroides.

No entanto, a limitação clínica do dipropionato de betametasona é a sua fraca permeabilidade através da pele, o que reduz a sua eficácia terapêutica no sítio alvo. A principal limitação reside na função de barreira da pele (ALAM et al., 2012). Por conseguinte, os maiores desafios para a formulação tópica são proporcionar um aumento suficiente na penetração do fármaco na pele, sem qualquer alteração significativa funcional e histológica da mesma e, também, a alteração irreversível da função de barreira da pele (PUGLIA et al., 2008; ALAM et al., 2012).

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 et al., 2009). Em 2009, Lin e colaboradores

identificaram o isômero dipropionato de lumibetametasona, obtido por fotoindução, a partir de uma solução do fármaco.

A associação do dipropionato de betametasona a nanocarreadores é descrita 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, com diâmetro médio de partícula na faixa de 140 a 180 nm, os quais proporcionaram uma melhor penetração do fármaco na pele.

Abdel-Montaleb e colaboradores, em 2012, desenvolveram nanopartículas poliméricas de etilcelulose com marcador fluorescente *Nile red* para a liberação seletiva do fármaco na pele inflamada. Para os testes, as nanopartículas foram administradas em um modelo experimental de inflamação para a dermatite em orelhas de ratos. Observaram que as nanoestruturas de menor tamanho apresentaram cerca de três vezes maior tendência de penetração com um acúmulo preferencial nos folículos pilosos da pele inflamada e glândulas sebáceas. A betametasona foi utilizada como fármaco modelo entre os glicocorticoides tópicos, assim, as nanopartículas de betametasona confirmaram a dependência do tamanho para ser terapeuticamente mais eficiente no exame histológico e na avaliação dos diferentes marcadores inflamatórios na pele.

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo como núcleo oleoso o óleo de borragem, em associação com dipropionato de betametasona. As nanocápsulas apresentaram tamanho médio de partículas com cerca de 200 nm, teor de fármaco próximo ao valor teórico ($0,50 \pm 0,03$ mg/mL) e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100%, e possibilitaram aumentar a estabilidade do fármaco frente a radiação UVC; entretanto, foram estáveis por um período de 15 dias a temperatura ambiente (WEBER et al., 2015).

3.3 Óleo de semente de *Borago officinalis* L.

Os óleos vegetais são obtidos de sementes, amêndoas e frutos de variadas 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 emoliente e hidratante (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000; ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004; SIGER; NOGALA-KALUCKA; LAMPART-SZCZAPA, 2008).

Muitas substâncias lipídicas são utilizadas como excipientes em preparações farmacêuticas e cosméticas. Dentre eles, destaca-se o óleo de borragem, o qual pode ser utilizado como um princípio ativo ou veículo na fase oleosa. Seu uso tópico é recomendado para evitar o aparecimento de rugas, o envelhecimento e combater a desidratação e a perda de elasticidade da pele (papel essencial do ácido γ -linolênico) (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000).

A espécie *Borago officinalis* L. é uma planta herbácea anual pertencente à família das Boragináceas, nativa da região do Mediterrâneo, também cultivada no Canadá (HAFID; BLADE; HOYANO, 2002), Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e na América do Sul (HERRMANN; JOPPE; SCHMAUS, 2002). Possui ação antiespasmódica, anti-hipertensiva, antipirética, afrodisíaca, diurética, emoliente, além ser utilizada no tratamento de asma, bronquite, cólicas, diarreia, palpitações e doenças renais (GILANI; BASHIR; KHAN, 2007).

O óleo de borragem apresenta em sua composição ácidos graxos poli-insaturados como, o ácido linoleico (35-40%) e o ácido γ -linolênico (22-24%), embora alguns produtos individuais possam conter maior ou menor quantidade. Além destes, apresenta ácidos graxos saturados e monoinsaturados e ácidos graxos da série ômega-9. O teor de ácido γ -linolênico no óleo de borragem é mais elevado do que na maioria de outros óleos semelhantes (GUNSTONE, 1992; HORROBIN, 1992; LANDI, 1993; BARRE, 2001). Além desses, estudos fitoquímicos revelam a presença de taninos, resinas, ácido ascórbico, beta-caroteno, niacina, riboflavina, tiamina, ácido silícico, colina arabinose, alcaloides pirrolizidínicos, polifenóis e flavonoides (GILANI; BASHIR; KHAN, 2007).

Os alcaloides pirrolizidínicos são responsáveis pela hepatotoxicidade e atividade carcinogênica do óleo, porém, esse apresenta baixos níveis desse composto, o que exige cautela somente quando seu uso for excessivo ou prolongado (LANGER; FRANZ, 1997; HERRMANN; JOPPE; SCHMAUS, 2002; CONFORTI et al., 2008).

O óleo de borragem contém altos níveis de ácidos graxos essenciais da série ômega 6 (ω -6) que são particularmente importantes na estrutura e função da pele, entre outras atividades (WRIGHT, 1991; FOSTER et al., 2010). No organismo, ocorre a conversão do ácido linoleico pela ação catalítica da enzima Δ 6-desaturase em ácido γ -linolênico, que forma

o ácido dihomo-gama-linolênico (ADGL) e o ácido araquidônico. Porém, no eczema atópico essa biossíntese não ocorre de forma natural na pele humana devido à carência da enzima $\Delta 6$ -desaturase, afetando potencialmente a produção de todos os metabólitos seguintes. A suplementação com óleo de borragem funciona como fonte de ácido γ -linolênico que não é mais formado pelo metabolismo. Estudos mostraram que a dermatite atópica é associada com o aumento dos níveis de ácido linoleico e a diminuição dos níveis dos produtos subsequentes (AGL, DGLA, e /ou ácido araquidônico) (ENGLER; ENGLER, 1998; BROSCHE; PLATT, 2000; FOSTER et al. 2010).

Os desequilíbrios dos ácidos graxos essenciais no organismo foram mostrados no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos que precedem o desenvolvimento de dermatite atópica (GALLI, 1994), no leite materno de mães de bebês que posteriormente desenvolveram dermatite atópica (WRIGHT; BOLTON, 1989; BUSINCO et al., 1993), e dosagens no tecido adiposo, fosfolipídeos do soro, plasma, células sanguíneas vermelhas e células mononucleares de crianças e adultos com dermatite atópica estabelecida (MANKU et al., 1982; MANKU et al., 1984; STRANNEGARD; SVENNERHOLM; STRANNEGARD, 1987; WRIGHT; SANDERS, 1991; LINDSKOV; HOLMER, 1992; OLIWIECKI et al., 1991; SHIMASAKI, 1995; HORROBIN, 2000). No entanto, nem todos os dados têm demonstrado claramente essa relação (FOSTER et al., 2010).

A literatura reporta alguns trabalhos com o óleo de borragem demonstrando o seu potencial em diminuir sintomas como coceira, exsudação, edema e formação de vesículas (ANDREASSI et al., 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 óleo de borragem 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 óleo de borragem, e sugerem que esse efeito deve-se a presença de certos compostos antioxidantes.

3.4 Sistemas nanoestruturados

3.4.1 Considerações

A nanotecnologia tem sido foco de estudo em diferentes áreas, apresentando uma importante aplicabilidade na administração de fármacos e ativos cosméticos (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Na área farmacêutica, sua importância dá-se pelo fato de exercer um controle na liberação de fármacos de forma precisa, reprodutível e segura, proporcionando o direcionamento do fármaco no local de ação específico, bem como modificar suas propriedades (SCHAFFAZICK et al., 2003a; HUYNH et al., 2009; MISHRA; PATEL; 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 sistemas nanoestruturados 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 coloidais sólidas, classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, diferindo na estrutura e composição. As nanocápsulas apresentam uma estrutura vesicular e são compostas de um núcleo, geralmente, 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., 2003a; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Atualmente, em virtude de modificações na composição, foram desenvolvidas nanocápsulas com um núcleo contendo uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano), sendo essas designadas por nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009; ZANOTTO-FILHO et al., 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 (FREITAS et al., 2006; CHOI et al., 2009; KHOEE;

HOSSAINZADEH, 2010; ZULFAKAR et al., 2010; ESMAEILI et al., 2011; RIGO et al., 2011; SANTOS et al., 2014; WEBER et al., 2015).

O desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleos vegetais possui como vantagem a possibilidade destes sistemas em estabilizar seus componentes e/ou substâncias ativas, como foi verificado para a benzofenona-3 utilizando os óleos de semente de uva e amêndoas (ALMEIDA et al., 2009).

Dentre as vias de administração destes nanocarreadores, a aplicação tópica 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 et al., 1995; MARCHIORI et al., 2010; NEMEM; LEMOS-SENA, 2011).

A utilização das nanopartículas poliméricas como forma alternativa no tratamento de doenças tópicas tem como vantagens a modulação da absorção transdérmica, a capacidade de adesividade do produto e a liberação homogênea devido à 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). Além disso, a inclusão destes nanocarreadores em bases semissólidas (géis ou emulsões) demonstra outros benefícios relacionados à aplicação na pele. As formulações semissólidas podem ter viscosidade controlada, devido à modificação de suas propriedades reológicas, o que influencia na espalhabilidade do produto sob a pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

O desenvolvimento de hidrogéis contendo nanocarreadores é descrito 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 nesses estudos têm-se: Aristoflex[®] AVC (SAVIAN, 2012; HÄRTER, 2013); Carbopol[®] 940 (MILÃO; KNORST; GUTERRES, 2003; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; ALVES et al., 2007); Carbopol[®] Ultrez 10 NF (MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011; FONTANA et al., 2011; SCHIAVO, 2014; FLORES et al., 2014); Carbopol[®] 981 NF (SHAH et al., 2012); Pluronic[®] F127 (DESAI; BLANCHARD, 2000; MIYAZAKI; TAKAHASHI; KUBO, 2003) e Natrosol[®] 250M (LUENGO et al., 2006; SCHIAVO, 2014) e Hidroxipropilmetilcelulose (BATHEJA et al., 2011).

3.4.2 Desidratação de nanopartículas

A estabilidade das nanopartículas em meio aquoso é limitada e a conversão destas em materiais desidratados tem possibilitado contornar este entrave. Além disso, os produtos secos obtidos podem ser convertidos em outras formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, preparações semissólidas, entre outras (BECK et al., 2012). Em meio aos métodos utilizados para este fim, podem ser citados a liofilização (AUVILLAIN et al., 1989; DE CHASTEIGNER et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003b; ABDELWAHED et al., 2006a; ABDELWAHED et al., 2006b; HIRSJARVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009) e a secagem por aspersão (MULLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2006; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2006; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009; BECK et al., 2012).

A secagem por aspersão ou *spray-drying* é uma técnica usualmente empregada para a desidratação de suspensões de nanopartículas. Este método é largamente empregado na área farmacêutica e apresenta como vantagens a rapidez na preparação, maior facilidade de transposição de escala e a possibilidade de aplicação para substâncias termossensíveis (RÉ, 2006; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Além disso, é um processo rápido e de baixo custo, no qual são obtidos produtos secos com baixos teores de umidade e, conseqüentemente, com um longo período de vida útil em prateleira (SHABDE; HOO, 2006; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; GHARSALLAOUI et al., 2007; BECK, et al., 2012). Entretanto, possui como desvantagens a necessidade de grandes volumes de formulação, emprego de altas temperaturas, além da perda de rendimento devido à adesão do pó na torre de secagem (VICENT et al., 2012).

A liofilização, também conhecida como *freeze-drying*, é um processo que consiste na remoção da água de uma amostra congelada por sublimação e dessorção sob vácuo. O ciclo da liofilização pode ser dividido em três etapas: congelamento (solidificação da amostra), secagem primária (sublimação de gelo) e a secagem secundária (dessorção da água descongelada) (ABDELWAHED et al., 2006a).

Esse procedimento é muito utilizado para a desidratação de nanopartículas, no entanto, essa técnica pode gerar várias tensões durante o congelamento e a desidratação. Deste modo, crioprotetores são geralmente adicionados à formulação para proteger as nanopartículas das condições que podem ocasionar estas tensões, e, também, para aumentar a estabilidade das

formulações durante o armazenamento (CHACON et al., 1999; ABDELWAHED et al., 2006a, KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007).

Usualmente, os crioprotetores mais utilizados são os carboidratos, sendo os mono e dissacarídeos os mais efetivos quanto ao predomínio das características iniciais da formulação, principalmente em relação à manutenção do tamanho de partícula da suspensão original. Por proporcionarem uma alta temperatura de transição vítrea, o efeito desses açúcares como crioprotetores é conferido à formação de uma matriz com características amorfas, que acabam protegendo quanto às tensões mecânicas dos cristais de gelo e promovem um espaçamento, evitando a agregação das partículas durante o congelamento, possibilitando ao produto final a sua fácil redispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003b, ABDELWAHED et al., 2006a; KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). Do mesmo modo, uma distribuição mais homogênea do crioprotetor e das nanopartículas com o fármaco conduzem a pós mais redispersáveis (CHUNG; LEE; LEE, 2012).

A trealose é um açúcar classificado como dissacarídeo e apresenta elevada solubilidade em água, conseqüentemente, com maior capacidade de redispersão aquosa, o que é importante para a permanência das características iniciais das formulações originais (JAIN; ROY, 2009). Além disso, apresenta alta temperatura de transição vítrea (~117 °C), contribuindo de forma significativa para as propriedades de estabilização das formulações (BHARDWAJ; SURYANARAYANAN, 2012). É um crioprotetor usualmente utilizado na desidratação de nanopartículas poliméricas (CHACON et al., 1999; JAEGHER et al., 1999; SAEZ et al., 2000; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; KAMIYA et al., 2006; HIRJARVI et al., 2009). Dentre os primeiros estudos pode-se mencionar o realizado por Auvillain e colaboradores (1989) na preparação de produtos secos a partir de nanocápsulas de PCL utilizando a trealose na proporção de 30 % (m/v). Esta concentração foi necessária para preservar a integridade das nanocápsulas durante o processo de congelamento e desidratação. Além disso, o congelamento de forma rápida e a temperatura de fusão do óleo encapsulado contribuíram para uma boa liofilização.

De acordo com a literatura (Tabela 1), vários estudos demonstram a tentativa de secagem das nanodispersões coloidais. A utilização de diferentes crioprotetores em cada trabalho mostra a dificuldade de sucesso na liofilização de tais vetores. Micro e nanoesferas, nanocápsulas e lipossomas tem sido estudados.

Tabela 1- Formulações submetidas à liofilização

Crioprotetores	Vetor	Congelamento	Referência
Glicose, trealose, manitol, sorbitol	Microesfera e nanopartícula encapsuladas ou não com ciclosporina	-196 °C por 15 min, -70 °C por 72 h	CHACON et al., 1999
Sacarose, glicose, hidroxipropil β ciclodextrina, PVP, manitol e manitol + NaCl	Nanocápsulas	-45 °C por 2 h	ABDELWAHED et al., 2006b
Aerosil 200®	Nanocápsulas e nanoesferas de diclofenaco	-20° C	SCHAFFAZICK et al., 2003b
Trealose, lactose, glicose, manitol	Nanoesferas esterilizadas por filtro 0,22 μ m	-60 °C por 10 min	KONAN; GURNY; ALLÉRMANN, 2002
Glicose, sacarose, trealose, lactose, manitol, dextrano, gelatina, sorbitol	Nanoesferas com ciclosporina.	-45 °C na prateleira do aparelho	SAEZ et al., 2000
Sacarose, manitol, trealose, lactose, sorbitol, glicose, dextrano 70000, gelatina e PVP	Nanoesferas obtidas por emulsificação-difusão	-55 °C por 10 min -196 °C por 90 s	QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998
Glicose, sacarose, trealose, dextrano, manitol	Nanoesferas obtidas por nanoprecipitação	-60 °C por 3 h	DE CHASTEIGNER et al., 1996
Maltose, lactose, sacarose	Lipossomas de budesonida	-70 °C	JOSHI; MISRA, 2001
Trealose, sacarose, lactose, glicose, polaxamer 188, lactose + glicose, lactose + polaxamer, glicose + polaxamer	Nanopartículas de PLA	-40 °C por 240 min	HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009)
Sacarose e PVP	Nanocápsulas de PCL	-45 °C por 2 h	ABDELWAHED et al., 2006d
Sacarose	Nanopartículas de PLGA (Nanoprecipitação modificada)	Não mencionado	YADAV; SAWANT, 2010
Solução de gelatina	Nanocápsulas de PCL	-15 °C -20 °C -40 °C	NAKAGAWA et al., 2011

Crioprotetores	Vetor	Congelamento	Referência
PVP, sacarose, manitol e glicose	Nanocápsulas de vitamina E	-45 °C por 120 min	KHAYATA et. al., 2012
Sacarose, maltose, trealose, glicose e galactose	Nanopartículas lipídicas contendo griseofulvina	- 35 °C por 24 h	KAMIYA et. al., 2006
Trealose	Nanopartículas	-55 °C por 10 min	JAEGHERE et.al., 1999
Trealose, dextrose, manitol e sacarose	Nanopartículas de PLGA contendo coenzima Q10	Não mencionado	SWARNAKAR et al., 2011
Manitol, sacarose e trealose	Nanopartículas de albumina HI-6	Não mencionado	DADPARVAR et al., 2014

Como a trealose foi o crioprotetor de escolha deste trabalho, verificou-se alguns estudos realizados e a concentração utilizada. Jaeghere e colaboradores (1999) desenvolveram nanopartículas de PLA-PEO e observaram que a liofilização sem crioprotetor resultava em aglomeração de partículas, obtendo um alto índice de ressuspensão; no entanto, quando empregaram a razão 1/1 [trealose (g)/nanopartículas (g)] observaram que entre as 10 amostras, a maioria recuperou o tamanho de partícula inicial, sendo que, para as três amostras que possuíam maior concentração de PEO foi necessário usar a razão de 2,5/1. Chacon e colaboradores (1999) liofilizaram nanopartículas e microesferas sob as condições experimentais descritas na tabela 1, porém não conseguiram obter nanopartículas com o mesmo tamanho de partícula que a suspensão original. Já, as microesferas foram liofilizadas com sucesso, sendo que, microesferas carregadas com ciclosporina A foram estáveis sob a forma liofilizada se congeladas a -70 °C com 5% de crioprotetores (glicose, trealose, manitol, sorbitol). Saez e colaboradores (2000) realizaram a liofilização de nanoesferas de PCL com vários tipos de crioprotetores em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30%) e os melhores resultados foram com a utilização de 20% de glicose e de sacarose. Konan e colaboradores (2002) avaliaram a utilização de diferentes razões de crioprotetor: nanopartículas 0,15; 0,25; 0,5; 1 e 2 para 1 e observaram que as maiores concentrações de crioprotetor (trealose, lactose, glicose, manitol) foram melhores, a partir da razão 0,5:1 obtendo um bom índice de ressuspensão em água. Kamiya e colaboradores (2006) obtiveram produtos desidratados a partir de nanopartículas lipídicas contendo griseofulvina, utilizando crioprotetores como a sacarose, a maltose e a trealose a 5 % (m/v), com o intuito de aumentar sua estabilidade. Os pós liofilizados apresentaram tamanho de 55 a 65 nm, semelhantes às formulações originais

(45 a 50 nm), adequada redispersão em água e estáveis por um período de 6 meses à 25°C. Hirsjarvi e colaboradores (2009) empregaram a liofilização como método de desidratação de nanopartículas de PLA preparadas por nanoprecipitação e os melhores crioprotetores foram a trealose e a sacarose nas concentrações de 2 e 5% (m/v). Swarnakar e colaboradores (2011) utilizaram 5% (p/v) de trealose, sendo que o melhor índice de ressuspensão e valores satisfatórios (tamanho de partícula, PDI e teor de substância) durante a estabilidade de 6 meses foram encontrados com esse crioprotetor. Em outro estudo, Dadparvar e colaboradores (2014) empregaram diferentes concentrações de trealose (1%, 2% e 3% p/v) e a formulação de escolha para o teste de estabilidade foi na concentração de 3%, a qual foi armazenada em diferentes temperaturas (-20 °C, 4 °C, 20 °C e 40 °C) durante 3 meses. Na temperatura de -20 °C, não ocorreu degradação significativa em relação ao teor e na análise do tamanho de partículas, também não diferiu em -20 °C , assim como, em 4 e 20 °C.

CAPÍTULO 1: Betamethasone-loaded lipid-core nanocapsules and its lyophilized product: characterization and release study

Betamethasone-loaded lipid-core nanocapsules and its lyophilized product: characterization and release study

M.T. Bazana¹, A.S. Gonçalves², C.B. Silva¹

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

²*Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.*

Correspondence: 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, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220-8452, Fax: +55 55 3220-8248

E-mail: csbona@smail.ufsm.br

ABSTRACT

Context: The lipid-core nanocapsules have an oily core they can be used as lipophilic drugs and with combined vegetable oils to get synergistic action. Several advantages with the use of vegetable products have attracted researchers' attention, such as the improvement of the pharmacological and therapeutic activities, which can provide their topical application.

Objective: This study aimed to prepare and characterize lipid-core nanocapsules containing betamethasone dipropionate and borage oil and its lyophilized products. Furthermore, evaluate *in vitro* drug release.

Methods: Formulations with and without the drug were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer. Suspensions were characterized relative to mean particle size, zeta potential, pH, drug content, encapsulation efficiency, viscosity, nanocrystals test and drug distribution in lipid-core nanocapsules. The redispersed powders were evaluated relative to mean particle size, yield, resuspension index, morphological, drug content and distribution of particle size. In addition, *in vitro* drug release studies were carried out using the dialysis bag method for suspensions and redispersed powders.

Results and Discussion: Lipid-core nanocapsules presented nanometric size particles (185-210 nm), polydispersity index below 0.10, negative zeta potential, pH slightly acid (6.0-6.5), constant viscosity, absence of nanocrystals and majority drug distribution in the core. Moreover, the drug content was close theoretical concentration ($0.25 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ of betamethasone), and the encapsulation efficiency was approximately 100%. Relative to lyophilization, dehydrated products showed nanometric mean size particles (190-250 nm), polydispersity index below 0.35, resuspension index (1.0-1.2), yield around 93% and betamethasone concentration close theoretical concentration. The betamethasone dipropionate release profile from nanocapsules and redispersed powders followed monoexponential model and showed controlled release.

Conclusion: The lipid-core nanocapsules and their lyophilized product showed appropriate physical and chemical characteristics, showing that association of BO and BD can be promising to incorporate at semisolid formulations for drug topical delivery.

Key words: *Nanocapsules, betamethasone dipropionate, borage oil, freeze-drying.*

1 INTRODUCTION

Development at nanoscale biodegradable delivery systems has been of great interest in recent years because these vehicles are capable to control the release of drugs. It is assumed that the nanocarriers obtain a higher effect with minimal toxicity due to the drug controlled delivery to the target site and to the decrease in its systemic distribution, as well as to protect the encapsulated drugs from *in vivo* early metabolization and elimination, improving their pharmacokinetic profile¹⁻⁷.

Among these nanocarriers, stands out polymeric nanoparticles that can significantly alter the drug pharmacokinetics and body distribution. While the free drug distribution occurs at all tissues and organs, the encapsulated drug distribution is imparted by the characteristics of the carrier^{1,3,5}. Polymeric nanoparticles are colloidal systems that have received more attention due to their potential use as drug carriers⁸ and their ability in controlling the encapsulated drugs release⁹⁻¹¹.

Nanocapsules are vesicular carriers of oily or aqueous core constitution surrounded by a polymeric wall⁸. Recently, a new type of nanocapsules have been developed, named lipid-core nanocapsules¹² in which the lipid-core is a mixed oil and a solid lipid (sorbitan monostearate) surrounded by a polymeric membrane such as poly(ϵ -caprolactone) an aliphatic polyester¹²⁻¹⁶.

Additionally, their small size facilitates their dermatological products formulation and enables comfortable skin application¹⁷. However, long-term or inappropriate glucocorticoids use is known to cause a variety of adverse events such as skin atrophy, rosacea and epithelial barrier dysfunction at the application site¹⁸. Betamethasone dipropionate (BD) is a highly potent glucocorticoid receptor agonist that has immunosuppressive, anti-inflammatory, and anti-proliferative effects. Exercise its action by inhibition of the phospholipase A2 which leads to the inhibition of arachidonic acid synthesis and controls the prostaglandins and leukotrienes biosynthesis. However, the BD clinical limitation has poor permeability through skin which reduces its therapeutic effectiveness at the target site¹⁹. Furthermore, the impurities presence from its synthesis process or from exposure to acidic or alkaline conditions can generate degradation products, compromising their use²⁰.

Vegetable oils are also used in the nanocarriers development for topical application, as demonstrated by some authors^{15,16,21-23}. Borage oil (BO), obtained from the seeds of *Borago officinalis* L., when used alone or in combination with drugs, has shown to be satisfactory for

the treatment of skin diseases as atopic dermatites and psoriasis²⁴⁻³⁰. Moreover, it has been noted for its emollient and anti-inflammatory effects, especially by containing high levels of the ω -6 series essential fatty acid that are important in skin structure and function^{29,31}.

These carriers are obtained in aqueous suspensions form, being susceptible to physical and chemical instability, microbial contamination and hydrolysis of the polymer due to storage³². The conversion of the systems in dehydrated materials has enabled overcome these disadvantages. In addition, the dried products obtained can be converted into other pharmaceutical ways such as tablets, capsules, semisolid preparations, among others³³. Among the dry processes, lyophilization allows obtaining systems with high yield and low thermal stress³⁴.

In this context, the aim of this study was to develop redispersible powders using lyophilization as the drying method from the lipid-core nanocapsules containing betamethasone dipropionate and borage oil with a concentration adapted from formulations developed by Weber and colleagues¹⁶. Because the suspensions had low stability time and little control release. Furthermore, evaluate the physical and chemical characteristics and the profile of *in vitro* drug release.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Betamethasone dipropionate (BD) was obtained from Valdequímica Chemicals Ltda. (São Paulo, Brazil); borage oil (BO) was purchased from Mundo dos óleos (Brasília, DF, Brazil); poly(ϵ -caprolactone) - PCL (Mn = 70000-90000) and sorbitan monostearate (Span[®] 60) were purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil); polysorbate 80 (Tween[®] 80) was obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil); trehalose (Hayashibara, Japan) was kindly provided by Tovani Benzaquen Repr. Ltda (São Paulo, Brazil); acetonitrile and methanol were obtained from chromatographic grade Tedia (São Paulo, Brazil). Other solvents and reagents were analytical or pharmaceutical grade, used as received.

2.2 Preparation and physicochemical characterization of lipid-core nanocapsule suspensions

2.2.1 Preparation of lipid-core nanocapsules

Nanocapsules were developed by Weber et al.¹⁶ and adapted to a different concentration of drug. The lipid-core nanocapsules (BD-NC_{OB}) were prepared in triplicate by interfacial deposition of preformed polymer¹². The organic phase composed of sorbitan monostearate (0.191g), PCL (0.5 g), BO (0.916 g), BD (0.016 g) and acetone (265 mL) was heated for one hour at a 40 °C temperature in order to dissolve the components. The organic phase was injected, under stirring, into the aqueous phase consisting of Tween[®] 80 (0.383 g) and water (265 mL). Stirring was maintained for 10 minutes after the formulation was concentrated in a rotary evaporator (40 °C) to eliminate the organic solvent, adjusting the betamethasone concentration (0.25 mg.ml⁻¹) and the final volume (50 mL). Formulations without the drug (NC_{OB}) were also prepared and evaluated. After preparation, formulations were stored in amber glass flasks at room temperature and light protected. The formulations will be analyzed immediately after preparation.

2.2.2 Physicochemical characterization of nanocapsule suspensions

Particle size and the polydispersity index (PDI) were determined at 25 °C by photon correlation spectroscopy (PCS) (Zetasizer[®] Nano series, ZEN 3600, Malvern Instruments, UK) after, the previous samples were ultrapure water diluted at a 1: 500 (v/v) ratio. The zeta potential values were estimated on the basis of electrophoretic mobility on the same equipment at 25 °C, after dilution of the samples in a 10 mM NaCl aqueous solution. The pH was determined directly in the suspensions, using a potentiometer calibrated (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil) with buffer solutions pH 4.0 and 7.0.

The drug content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), according to previously methodology validated by our research group¹⁶, using an Agilent Technologies, 1260 Infinity (Germany) chromatograph. The mobile phase was formed by mixing acetonitrile:water (65:35, v/v); isocratic flow 1.0 mL min⁻¹ and detection at 254 nm; Gemini[®] C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, USA) and same manufacturer precolumn (4.0 x 2.0 mm, 5 µm). Injection volume was 20 µL. The chromatographic conditions followed the recommendations of the British Pharmacopoeia³⁵ and the method was validated following the specific parameters, linearity (5 – 40 µg mL⁻¹), precision and accuracy^{36,37}. For drug extraction, an aliquot of the nanocapsules (800 µL) was

diluted with methanol (obtaining a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ betamethasone concentration) and subjected to sonication and centrifugation. After this, the solution was filtered through nylon membrane ($0.45 \mu\text{m}$) and injected in the chromatograph.

The encapsulation efficiency was determined by centrifugation-ultrafiltration technique (AMICON 10,000 MW Ultra, Millipore, Bedford, USA). An aliquot of nanocapsules ($400 \mu\text{L}$) was used, submitting to centrifugation-ultrafiltration at $2200 \times\text{G}$ for 10 min. The ultrafiltrate was injected into the HPLC to determine the free betamethasone and calculated encapsulation efficiency through difference between total drug concentration and the concentration in the ultrafiltrate (free concentration).

Rheological analysis of the suspensions (NC_{OB} and BD-NC_{OB}) were performed using a rotational viscometer (LV DV-II+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK), equipped with a ULA apparatus. All analyses were carried out at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, in triplicate.

In order to verify nanocrystals presence, aliquots of the lipid-core nanocapsules (BD-NC_{OB}), in triplicate, were placed at an eppendorf and kept resting. After, only the supernatant was collected to determine the total content of betamethasone every seven days by HPLC, during 30 days.

2.3 Lipid-core nanocapsule drug distribution

Nanocapsules containing drug were diluted to different ratios and subjected to centrifugation-ultrafiltration. The ultrafiltrate was HPLC analyzed, following the algorithm proposed by Oliveira et al.³⁸ for further classification. The physical-chemical parameter value to predict the distribution type is $\log D$.

2.4 Preparation and characterization of dehydrated products

The BD-loaded lipid-core nanocapsules containing borage oil, after preparation, were mixed with trehalose (10%, w/v) as cryoprotector under magnetic stirring for 20 minutes. Initially, the samples were submitted to 24 h freezing at a $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature. After, dehydrated in lyophilizer (LIOTOP L 101, Liobras, São Paulo, Brazil) according the following conditions: $-55 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ initial temperature process, vacuum pressure lower than $500 \mu\text{Hg}$ and 48 h lyophilization time, obtaining the powders ($\text{L-BD-NC}_{\text{OB}}$). Lyophilized products were prepared in triplicate, packed in amber glass flasks and desiccator stored for further

characterization. To compare, lyophilized powders obtained from no drug suspensions (L-NC_{OB}) and trehalose water dispersions (T-D) were also prepared and evaluated.

Freeze-drying process yield was calculated by ratio between the experimentally obtained weight and the sum of all components weight (trehalose and nanostructures), discounting water content of the suspensions and multiplying result by 100.

The powders were redispersed in ultrapure water for subsequent mean particle size measurement (Zetasizer Nano series, ZEN 3600, Malvern Instruments, UK). Resuspension index was also calculated, which is the particle size recovery related to the original formulation (equation 1).

$$(1) \text{ Resuspension index} = S_f / S_i$$

Where S_f is the dried product mean particle diameter after water redispersion, and S_i is the original formulations mean diameter particles.

The dehydrated particles disintegration was evaluated 60 min after its water dispersion through laser diffraction (Mastersizer® 3000 E, Malvern, UK). Morphological analysis were performed by scanning electron microscopy (SEM) (Jeol JSM-6360, Tokyo, Japan), after gold metallization the samples. The particles form and surface were investigated.

Betamethasone content in lyophilized products was HPLC determined. For lyophilized powder extraction, an aliquot of 0.112 g was weighed, methanol diluted, stirred for 30 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. After, volume was completed using same solvent and an aliquot of the sample was filtered through nylon membrane (0.45 μm) and injected into the chromatograph.

2.5 Evaluation of *in vitro* release profile of BD from lipid-core nanocapsules and lyophilized powder

In vitro drug release profiles from BD-NC_{OB}, L-BD-NC_{OB} and BD-S (solution of BD in methanol) were evaluated ($n = 3$) by the dialysis bag method, using water:ethanol (70: 30 v/v) as medium, at 35°C,¹⁶ maintaining sink conditions. The dialysis bag (MWCO = 12,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, EUA), containing 1 mL of the sample (0.25 mg mL⁻¹) was placed into a 250 mL erlenmeyer containing 150 mL of dissolution medium under constant moderate stirring. One milliliter of the external medium was withdrawn from the system at predetermined time interval, replaced by same volume of fresh medium, and filtered through a 0.45 μm nylon membrane. BD samples were assayed by HPLC according to

validated method¹⁶. The method specificity was confirmed by the peaks absence at the chromatogram obtained with release medium. The method was linear (0.1 to 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 1\text{E}+06x + 173009$; $r = 0.9999$) and precise according to the employed analytical conditions. In order to obtain better understanding on the influence of polymeric material type at nanocapsules BD release behavior, was used a mathematical modeling (MicroMath[®] Scientist[®] for WindowsTM) to analyze the drug release profiles³⁹, using the following models: zero order, monoexponential, biexponential and Power Law. Appropriate model was chosen based on the best correlation coefficient (r), the largest selection criterious (MSC) and better graphical configuration.

2.6 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Experimental data were analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, at a significance 5% level.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The aqueous colloidal suspensions presented a macroscopic homogeneous appearance, similar to a milky bluish opalescent liquid (*Tyndall* effect), characteristic of colloidal systems^{21,40}. Physicochemical characteristics of the formulations after preparation are presented in Table 1.

Table 1 - Physicochemical characteristics of BD-loaded lipid-core nanocapsules containing borage oil (BD-NC_{OB} – 0.25 mg mL⁻¹ of betamethasone) and lipid-core nanocapsules without the drug (NC_{OB})

Formulation	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
NC _{OB}	198 \pm 10 ^a	0.07 \pm 0.04 ^a	- 9.49 \pm 1.16 ^a	6.29 \pm 0.15 ^a
BD-NC _{OB}	197 \pm 05 ^a	0.08 \pm 0.01 ^a	- 8.60 \pm 1.34 ^a	6.35 \pm 0.18 ^a

^a The data showed are the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means with the same letter are not significantly different (ANOVA).

All formulations showed mean particle size on nanometric range and polydispersity index below 0.10 indicating adequate system homogeneity. These values found using the same method for the preparation and particle size are in agreement with previous studies^{16,41-44}. The negative zeta potential values are a consequence of the polymer chemical nature, the stabilizing agent chemical nature and the medium pH⁶. These results are consistent with other studies at literature for prepared nanocapsules with PCL and polysorbate 80^{16,42-45}. Regarding the betamethasone content, the formulation presented next theoretical value (0.25 ± 0.01 mg mL⁻¹), the encapsulation efficiency was approximately 100% and showed slightly acid pH. The acidic pH values could be explained by the presence of terminal carboxylic groups in the polymeric chains (PCL) and the oil presence, consisting on fatty acids. Furthermore, the BD incorporation did not decrease pH, the opposite was observed for Weber et al.¹⁶. In addition, the particle size, polydispersity index, zeta potential and pH were not influenced by the presence of the drug in the formulations ($p > 0.05$), as can be seen comparing the results obtained at both formulations.

To determine the drug content in the suspensions and lyophilized products, the analytical method was validated with certain modifications relative to Weber et al.¹⁶. The method specificity was confirmed by the specific peak purity (peak purity index = 1.000), and no additional peaks in the chromatogram were obtained with at the solution prepared with blank nanocapsules (without the drug – NC_{OB}). The analytical method was linear in the concentration range 5 to 40 μ g mL⁻¹ ($542552x + y = 186470$; $r = 0.9999$). Through statistical analysis, significant regression was found ($F_{\text{calculated}} = 44004.6079 > F_{\text{tabulated}} = 4.96$) and no linearity deviation ($F_{\text{calculated}} = 0.9864 < F_{\text{tabulated}} = 3.71$). The method is accurate (DPR = 1.26% and 0.94% for repeatability of the suspensions and lyophilized, respectively), and accurate (recovery = $99.90\% \pm 1.00$) in accordance with the analytical conditions used; the drug retention time was 5.4 minutes. Betamethasone content of lipid-core nanocapsules and lyophilized products was near the theoretical value (0.25 ± 0.01 mg mL⁻¹ and 1.78 ± 0.02 mg/g, respectively), indicating no drug loss during nanocapsules preparation and no degradation or selective drug loss during the formulations dehydration process.

The colloidal suspensions presented 30 days stability, with similar characteristics as the evaluated parameters (Fig 1); acid pH (6.10 ± 0.11) and only the drug content showed a decrease to 93%. In Fig 2 can be seen zeta potential values as a time function and seven and thirty days there was a significant increase in modulus value compared to the initial time, but this change is not harmful, because zeta potential increase in magnitude is positive indicating better stability. It should be noted that the average particle size and homogeneity of

nanometric population are key characteristics of the nanoparticle systems to obtain better applicability, influencing the nanoparticles stability, as well as influencing the *in vivo* distribution, toxicity and drug release capacity at desired site of action^{46,47}. These results show that the drug concentration reduction for 0.25 mg mL⁻¹ was favorable, thus increasing the stability of suspensions because nanostructured systems with same nanocarrier containing borage oil on the same concentration (2 %) and betamethasone 0.50 mg mL⁻¹ developed by Weber et al.¹⁶ had only 15 days stability.

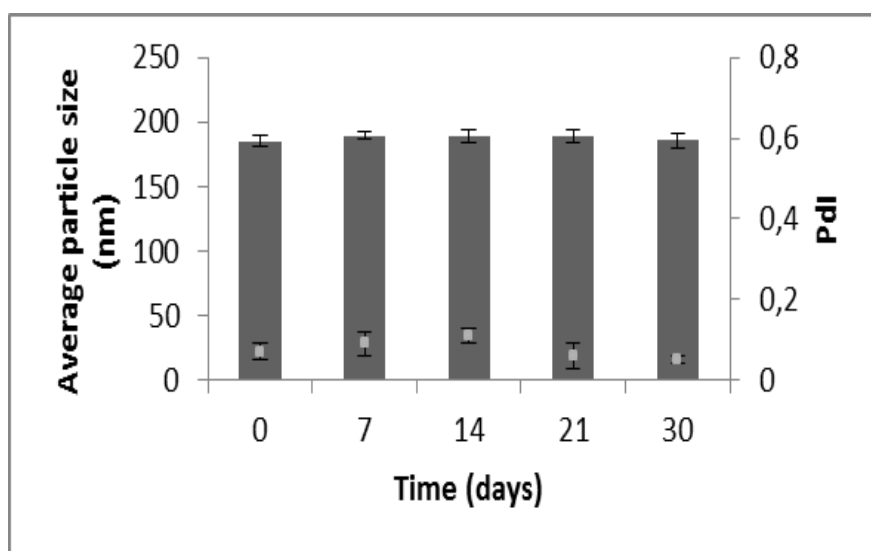


Figure 1. Graphical representation of mean particle size and polydispersity index (PDI) of the BD-loaded lipid-core nanocapsules storage during 30 days, at room temperature.

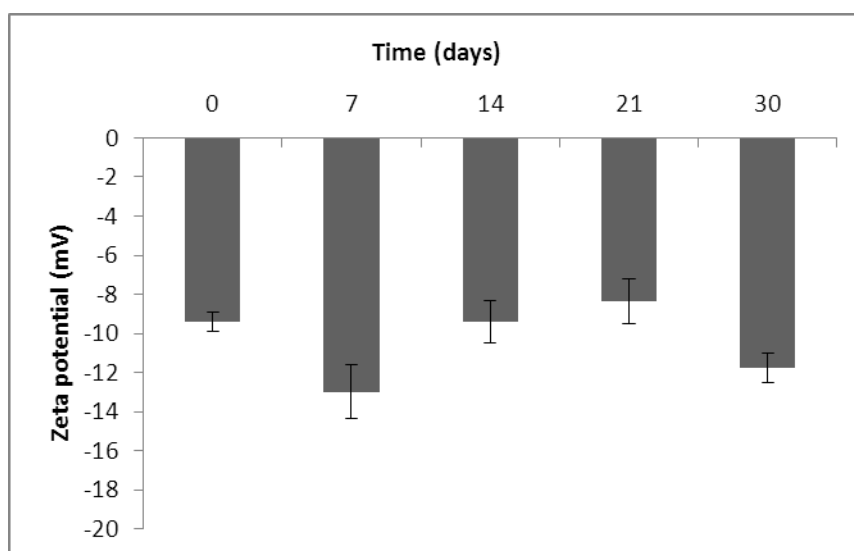


Figure 2. Graphical representation of the BD-loaded lipid-core nanocapsules zeta potential during 30 days storage, at room temperature.

At same time analysis of colloidal suspensions stability (30 days), aliquots were evaluated for the presence of nanocrystals. According to results, not statistically significant differences were observed for the content. From these results and knowing the logarithm of the drug octanol-water distribution coefficient ($\log D = 3.67$), we can infer that the BD-loaded lipid-core nanocapsules are IV and / or VI type, for his $\log D$ is similar to diclofenac and indomethacin ethyl ester. Further, IV and VI types are models of lipophilic drugs mainly colloid encapsulated. The difference between IV and VI types is that the drug is more concentrated at the pseudo-phase interface or at the core, respectively³⁸. To confirm this result, the ultrafiltration-centrifugation test was performed, and the content of betamethasone was determined by HPLC. The results obtained in this study showed that the nanocapsules are VI type, showing that most of drug is in the core and, corroborating with the test, showed the absence of nanocrystals.

The formulations viscosity was evaluated, obtaining: $1.15 \pm 0.005 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ and $1.14 \pm 0.004 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ for the BD-NC_{OB} and NC_{OB}, respectively. Fig 3 shows the rheological behavior of both formulations that presented Newtonian behavior, which is characterized by constant viscosity independent of shear rate⁴⁸ and linear relation between shear stress and shear rate. This rheological behavior is in agreement with other nanostructured suspensions described in the literature⁴⁹⁻⁵².

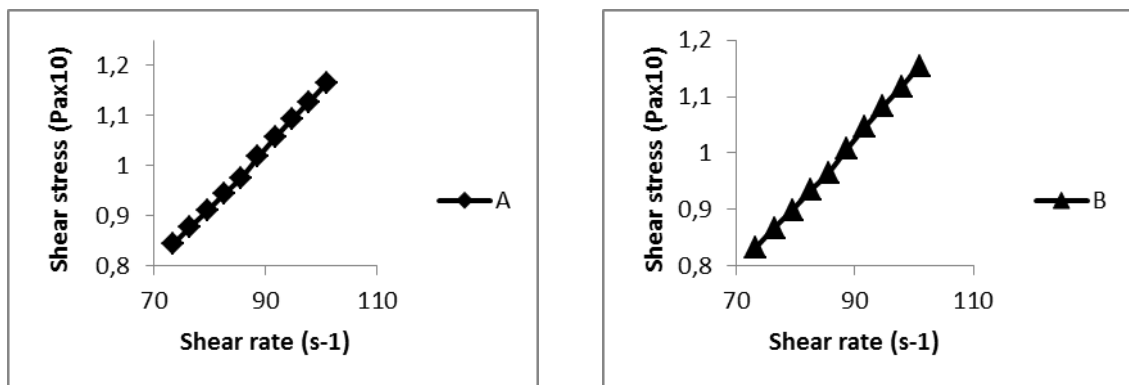


Figure 3. Rheogram of lipid-core nanocapsules (A) BD-NC_{OB} e (B) NC_{OB}.

When nanoparticles pass through the lyophilization process, its size, after water resuspension, can be changed, especially in the cryoprotectants absence, therefore, the analysis of the mean particle size of these samples is important to observe if this characteristic is maintained during the process^{53,54}. The mean particle size was analyzed by PCS, through the powders resuspended in purified water, obtaining values: L-NC_{OB} = 222 ± 31 ; L-BD-

$NC_{OB} = 236 \pm 23$ and $PdI = 0.35 \pm 0.01$ and 0.26 ± 0.01 , respectively. There was not change in the diameter of the resuspended particles in relation to suspensions developed (resuspension index of 1.12 ± 0.10 and 1.18 ± 0.10 , respectively). There are literature reports of studies corroborating that water redispersion of freeze-dried products remained similar characteristics to the original suspensions⁵⁵⁻⁵⁸. To indicate that the particles diameter presented no significant change during the freeze-drying process, it is necessary that the calculated resuspension index shows a value near to 1.0. Otherwise, if the value of the resuspension index was far from the unit, it can be said occurred the formation of particle aggregates^{53,59}.

Concerning to the yield of the dehydration process, the results obtained were $93\% \pm 0.63$ to L- NC_{OB} and $92\% \pm 0.34$ to L-BD- NC_{OB} , which is expected in this case. The betamethasone content in the lyophilized product, after preparation, was $101.31 \pm 1.19\%$ and approximate to the theoretical value (1.78 mg/g). Thus, it is clear that there was not degradation or selective drug loss during the dehydration process of the formulations. These values remained for 60 days, obtaining of drug content (1.78 ± 0.02 mg/mL).

Morphological analysis of the powders and cryoprotector was performed by SEM, and the images can be seen in Fig 4. At lyophilized trehalose (Fig 4A) it is possible to observe a smooth surface with absence of spherical particles in the structure formed by cryoprotective agent. Otherwise, microphotographs of the lyophilized BD-loaded lipid-core nanocapsules samples (Fig 4C and 4D) show a clearly rough surface due to the presence of approximately spherical structures. The nanostructures have typically this shape, and when in contact with the cryoprotectant on lyophilization process, is normal formation of an amorphous matrix of the cryoprotectant around the nanoparticles, as already reported in the literature⁵⁵. Swarnakar et al.⁶¹ used 5% (w/v) trehalose, obtaining a good resuspension index (1.04), satisfactory particle size, PdI and drug content result, and stability during 6 months with this cryoprotectant. In another study, Dadparvar et al.⁶² have used different concentrations of trehalose (1%, 2% and 3%, w/v) and presented SEM spherical and uniform shape. The formulation of choice for stability testing was at a concentration of 3%, been stored in different temperatures (-20 °C, 4 °C, 20 °C and 40 °C) for 3 months. At -20 °C there was no significant degradation in relation to the content and the particle size analysis presented no different at -20 °C as well as at 4 and 20 °C. To compare, was also performed photomicrographs of the physical mixture powders of trehalose and BD, presenting irregular edges and shapeless particles (Fig 4B).

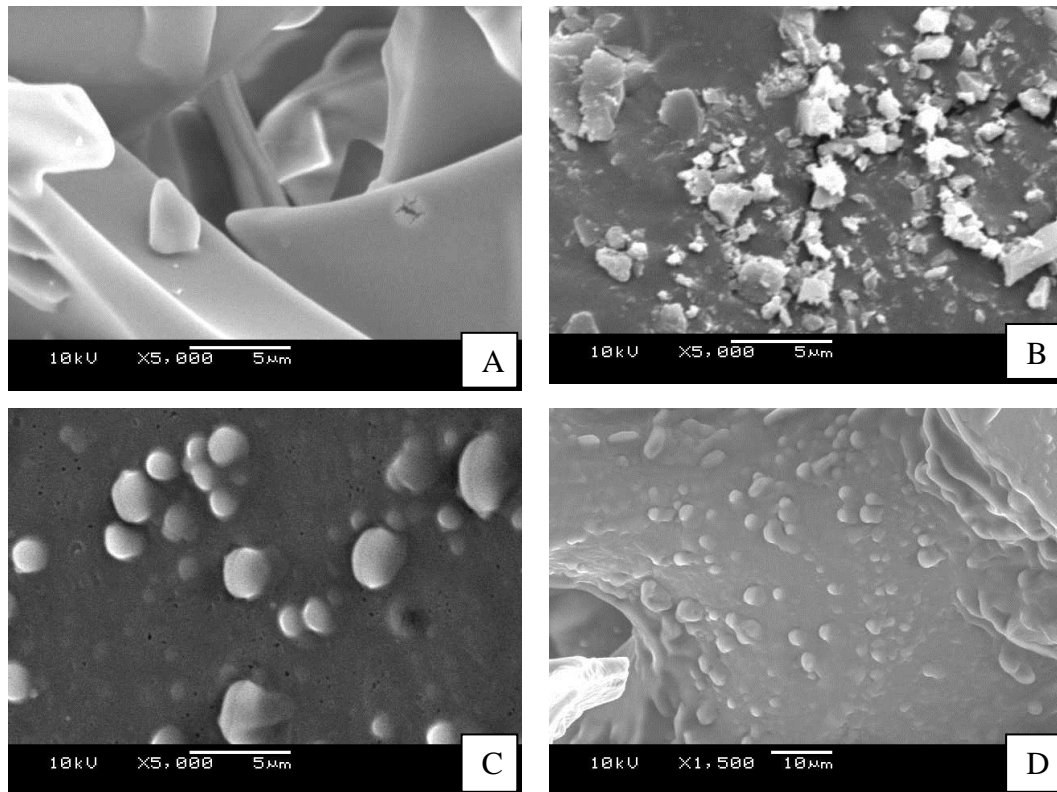


Figure 4. Images SEM obtained from lyophilized powders (increase of 5000X - bar corresponds to 5 μm). Trehalose (A); Trehalose and BD physical mixture (B), L-BD-NC_{OB} (C and D).

The lyophilized products were evaluated by laser diffraction after been purified water dispersed in order to verify the nanometric or micrometric particles size presence. The particle distribution profile of lyophilized products was compared to the nanocapsules suspensions with and without drug. Obtained results are shown in Fig 5 and 6. The graphics show a unimodal peak for two samples of particles majority in the nanometer range, which means that this system can be completely redispersible to achieve nanometric sizes. Furthermore, span values were close to 1, indicating good homogeneity (NC_{OB}: Span = 0.718 ± 0.009 ; L-NC_{OB}: = 1.091 ± 0.054 and BD-NC_{OB}: Span = 0.723 ± 0.012 ; L-BD-NC_{OB} = 1.045 ± 0.035). SEM analysis showed spherical-shaped nanocapsules with similar diameters regarding those determined by laser diffraction.

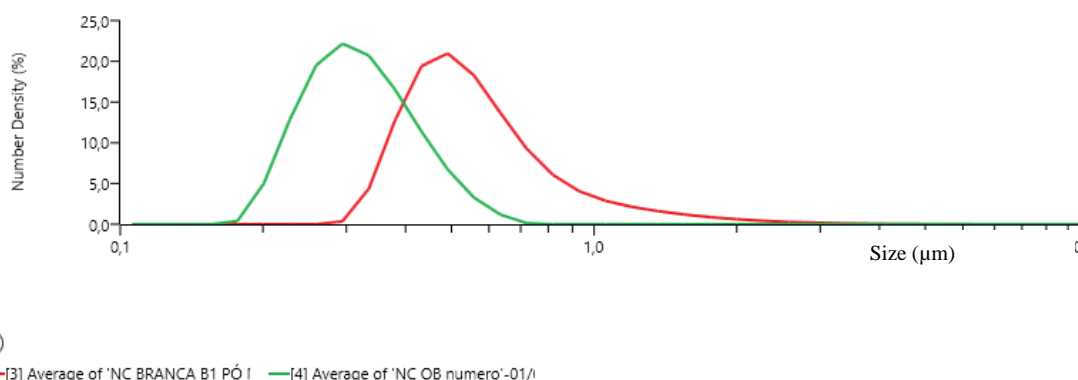


Figure 5. Particle size distribution by laser diffraction of NC_{OB} (green line) and L-NC_{OB} (red line).

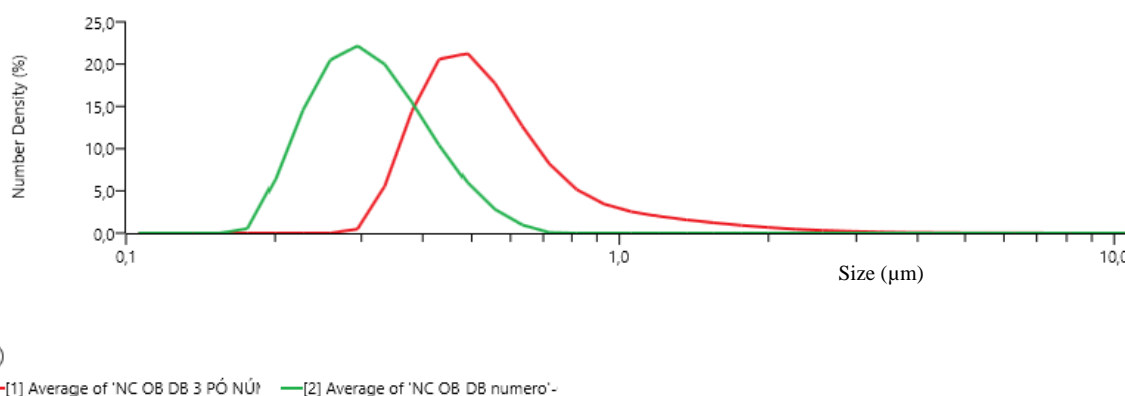


Figure 6. Particle size distribution by laser diffraction of BD-NC_{OB} (green line) and L-BD-NC_{OB} (red line).

The release study was performed in dialysis bags diffusion, usual for evaluating drug release kinetics from nanostructured systems^{6,16,62,63}. In this work, the experiment was conducted for 24 h for all samples. To ensure the diffusion process over the release study, maintaining sink condition was observed during all experiment period. The release profiles of BD from the lipid-core nanocapsule (BD-NC_{OB}) and resuspended powder (L-BD-NC_{OB}) were compared to a methanolic solution (free drug – BD-S).

The results showed that the lipid-core nanocapsules and reconstituted powder presented a drug controlled release compared to the no associate drug diffusion. The release profiles were obtained in drug released percentage as a function of time (Fig 7). It can be observed that the formulations BD-NC_{OB} and L-BD-NC_{OB} had similarly released, and showed statistically significant differences between 4 and 12 h ($p < 0.05$), but no difference ($p > 0.05$) in the early times (1 and 2 h) was verified, showing that the cryoprotectant presence not mainly

influenced the drug release, corroborating with the resuspension index determined by PCS. Comparing with the free drug, after 24 h, there was a 62% and 73% BD release of BD-NC_{OB} and L-BD-NC_{OB}, respectively, and approximately 100% for the BD-S.

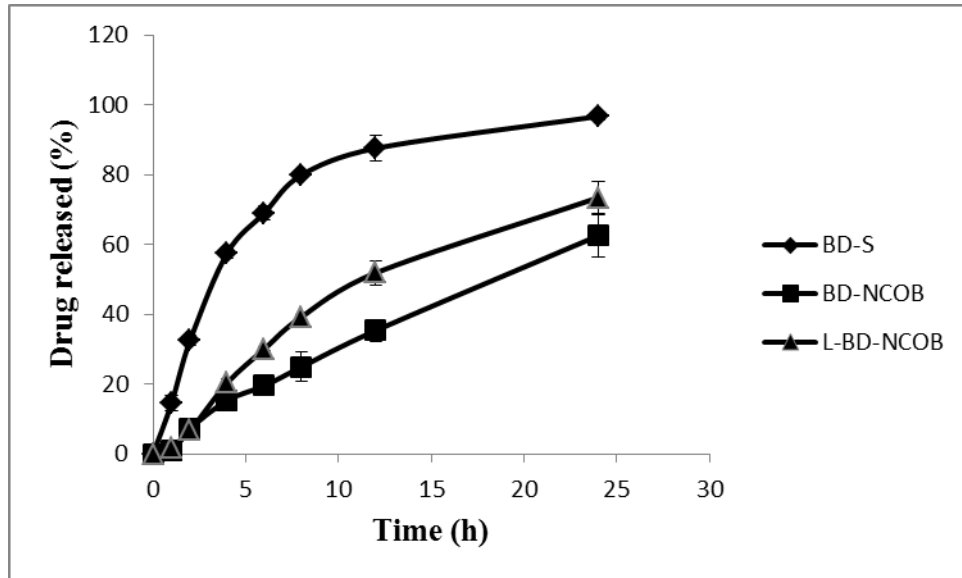


Figure 7. *In vitro* BD release profile from methanolic solution (BD-S), lipid-core nanocapsules (BD-NC_{OB}) and resuspended powders (L-BD-NC_{OB}) using dialysis bag method (n = 3).

From the mathematical modeling, we determined the BD release profile, being the monoexponential model ($r > 0.99$) which best describes the drug release from the analyzed samples. The first order equation (monoexponential) indicates that drug release occurs in a single stage and there was not a rapid initial release or burst effect. The modeling parameters are shown in Tab 2. These attainment results suggests that all betamethasone dipropionate fraction present in nanostructures is possibly confined inside the nanocapsules, corroborating the results of encapsulation efficiency, which was greater than 99% and the drug distribution characterized as type VI, in which the drug is mainly in the core of the nanocapsule.

Table 2. Calculated parameters through the first order model of BD from methanolic solution (BD-S), lipid-core nanocapsules (BD-NC_{OB}) and resuspended powders (L-BD-NC_{OB})

Monoexponential	BD-S	BD-NC _{OB}	L-BD-NC _{OB}
K (h ⁻¹)	0.1938 ± 0.0065	0.0383 ± 0.0025	0.0566 ± 0.0057
r	0.9977 ± 0.0016	0.9951 ± 0.0020	0.9945 ± 0.0020
MSC	5.2814 ± 1.0070	4.2633 ± 0.6484	4.0590 ± 0.1500

The formulations development in this work allowed a less BD release. This can be observed from the first collect, with significant difference in the amount of drug released from the solution regarding to the nanostructured formulations, liquid (BD-NC_{OB}) and resuspended powder (L-BD NC_{OB}) (p<0.05). The half-lives were calculated and it can be seen that the nanostructures maintained a slower drug release in relation to free drug (BD-NC_{OB}: t_{1/2} = 18.13 ± 1.17; L-BD-NC_{OB}: t_{1/2} = 12.34 ± 1.31; BD-S: t_{1/2} = 3.58 ± 0.12). Concerning to the half-lives of nanostructured formulations, BD-NC_{OB} showed statistically significant difference (p<0.05) compared to the L-BD-NC_{OB}.

The release mechanism was evaluated by Powers Law (Peppas-Korsmeyer), which establishes, for spherical geometry systems, limit values for the release exponent (n): n = 0.43 indicating Fickian diffusion; 0.43 < n < 0.85 corresponds to anomalous transport, and n ≥ 0,85 is associated with transport case II⁶⁴. The value obtained for the nanocapsules was 0.84 and the resuspended powders 0.72, indicating anomalous transport, which means that drug release is controlled by the polymer chains relaxation followed by diffusion of betamethasone dipropionate. Besides its higher lipophilic characteristic, PCL has a semi-crystalline structure, which means it presents more uniform arrangement of the molecules⁶⁵. In this case, the drug faces a larger diffusion resistance through the polymer matrix, taking a slower liberation of the drug.

Regarding to the same drug release study described by Weber et al.¹⁶ with the same type of nanocarrier, but with higher concentration of betamethasone (0.5 mg mL⁻¹) was observed faster drug release, around 80% in 12 h. When we analyze the mathematical modeling, both showed monoexponential behavior, but with differences in half-life times. While the formulation showed 6.83 ± 0.72, our study nearly tripled this value to 18.13 ± 1.17. Thus, the formulations of this study showed better release control, indicating that the drug concentration can interfere in this parameter.

Still, it should be noted that the results of release kinetics obtained in this study corroborates those reported in the literature, showing the nanocapsules ability in promoting the release controlled of several drugs^{16,43,63,66}.

4 CONCLUSION

The lipid-core nanocapsules and their lyophilized product showed appropriate physical and chemical characteristics, showing that association of BO and BD can be considered promising for drug topical delivery. Both liquid and solid nanostructures were able to control BD release, according to monoexponential model. Considering the Korsmeyer-Peppas model, the betamethasone release mechanism was determined by anomalous transport. Furthermore, due more stability of lyophilized products, they can be an alternative as intermediate product to incorporate at semisolid formulations for topical use.

REFERENCES

1. Owens ED, Peppas A.N. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006;307:93–102.
2. Bernardi A, Braganhol E, Jager E, Figueiro F, Edelweiss MI, Pohlmann AR et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett* 2009;281:53–63.
3. Bi R, Shao W, Wang Q, Zhang N. Solid lipid nanoparticles as insulin inhalation carriers for enhanced pulmonary delivery. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:84–92.
4. Sutthanut K, Lu X, Jay M, Sripanidkulchai B. Solid lipid nanoparticles for topical administration of Kaempferia Parviflora extracts. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:224–232.
5. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surf B* 2010;75:1–18.
6. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int J Pharm* 2010;385:113–142.
7. Oganessian EA, Miroshnichenko II, Vikhrieva NS, Lyashenko AA, Leshkov SY. Use of nanoparticles to increase the systemic bioavailability of trans-resveratrol. *Pharm Chem J* 2010;44:74–76.
8. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review, *Crit Rev Therap Drug Carrier Syst* 2002;19:99–134.
9. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudziski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Rel* 2001;70:1–20.

10. Rao GCS, Kumar MS, Mathivanan N, Rao MEB. Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems. *Pharmazie* 2004;59:5–9.
11. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2006;2:53–65.
12. Jäger E, Venturini CG, Polleto FS, Colomé LM, Pohlmann JPU, Bernardi A et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:130–140.
13. Ourique AF, Azoubel S, Ferreira CV, Silva CB, Marchiori MC, Pohlmann AR et al. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *J Biomed Nanotechnol* 2010;6:214–223.
14. Zanotto-Filho, A, Coradini, K, Braganhol E, Schröder R, De Oliveira CM, Simões-Pires A et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;83:156-167.
15. Rigo LA, Silva CR, Oliveira SM, Cabreira TN, Silva CB, Ferreira J et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;93:11–17.
16. Weber J, Funk NL, Motta MH, Guedes AM, Visintainer APC, Tedesco SB, Silva CB. Association of borage oil and betamethasone dipropionate in lipid-core nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; *in press*.
17. Perugini P, Simeoni S, Scalia S, Genta I, Modena T, Conti B et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Int J Pharm* 2002;246:37–45.
18. Fujii Y, Sengoku T, Takakura S. Repeated topical application of glucocorticoids augments irritant chemical-triggered scratching in mice. *Arch Dermatol Res* 2010;302(9):645–652.
19. Alam S, Baboota S, Ali S, Ali M, Alam N, Alam I, Ali J. Accelerated stability testing of betamethasone dipropionate nanoemulsion. *Int J Pharm Sci* 2012;4:1-4.
20. Shou M, Galinada WA, Wei Y-C, Tang Q, Markovich RJ, Rustum AM. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion®. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50:356-361.
21. Santos-Magalhães N S, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 2000;208:71–80.
22. Friedrich RB, Fontana MC, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quim Nova* 2008;31:1131–6.
23. Almeida JS, Jezur L, Fontana MC, Paese K, Silva CB, Pohlmann AR et al. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): Preparation and characterization. *Latin Am J Pharm* 2009;28:165–72.
24. Engler MM. 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 Leukot Essent Fatty Acids* 1993;49:809–814.
25. Andreassi M, Forleo P, Di Lorio A, Masci S, Abate G, Amerio P. Efficacy of gamma-linolenic acid in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Int Med Res* 1997;25:266–274.
26. Brosche T, Platt D. Effect of borage oil consumption on fatty acid metabolism, transepidermal water loss and skin parameters in elderly people. *Arch Gerontol Geriatr* 2000;30:139–150.

27. Barre DE. Potential of evening primrose, borage, black currant, and fungal oils in human health. *Ann Nutr Metab* 2001;45:47–57.
28. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol* 2008;116:144–151.
29. Foster RH, Hardy G, Alany RG. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. *Nutrition* 2010;26:708–718, 2010.
30. Linnamaa P, Savolainen J, Koulu L, Tuomasjukka S, Kallio H, Yang B et al. Blackcurrant seed oil for prevention of atopic dermatitis in newborns: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1247–1255.
31. Wright, S. Essential fatty acids and the skin. *Braz J Dermatol* 1991;125(6):503–515.
32. Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview. *Braz J Phys* 2009;39:205–209.
33. Beck RCR, Ourique AF, Guterres SS, Pohlmann AR. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2012;6:195–208.
34. Das SK et al. Solid Dispersions: An approach to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *IJPPT* 2011;1:37–46.
35. British Pharmacopoeia. 2010. London, v.2.
36. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Res RE nº 899, 29 may 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União. Poder Executivo*, 02 jun., 2003.
37. International Conference on Harmonization (ICH). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1).
38. Oliveira CP, Venturini CG, Donida B, Poletto FS, Guterres SS, Pohlmann AR. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter* 2013;9:1141–1150.
39. Cruz L, Soares LU, Dalla Costa T, Mezzalira G, Silveira NP, Guterres SS, Pohlmann AR. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm* 2006;313:198.
40. Guterres SS, Schaffazick SR, Pohlmann AR. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: Morales MM. *Terapias avançadas células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde*. São Paulo: Atheneu, 2007:247–264.
41. Bernardi A, Frozza RL, Jäger E, Figueiró F, Bavaresco L, Salbego C et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An *in vitro* study. *Eur J Pharmacol* 2008;586:24–34.
42. Ourique AF, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int J Pharm* 2008;352:1–4.
43. Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:254–63.
44. Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Pohlmann AR, Beck RCR et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quim Nova* 2011;34(6):968–972.
45. Marchiori ML, Lubini G, Dalla Nora G, Friedrich RB, Fontana MC, Ourique AF et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36:962–971.

46. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharma Res* 2006;5(1):561-573.
47. Jornada DS, Fiel LA, Bueno K, Gerent JF, Petzhold CL, Beck RCR et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter* 2012;8:6646-6655.
48. Chhabra RP, Richardson JF. *Non-Newtonian flow and applied rheology: engineering applications*. 2 nd ed. Oxford:Elsevier, 2008.
49. Hussein OA, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2009;10:808–819.
50. Shakeel F, Ramadan W, Ahmed MA. Investigation of true nanoemulsion for transdermal potential of indomethacin: Characterization, rheological characteristics, and *ex vivo* skin permeation studies. *J Drug Target*, 2009;17:435–441.
51. Marchiori MCL, Ourique AF, Silva CB, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. *J Nanosci Nanotechnol* 2012;12:2059-2067.
52. Katzer T, Chaves P, Bernardi A, Pohlmann A, Guterres SS, Beck RCR. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, in vitro drug release and eye toxicity. *J Microencapsul* 2014;31:519-528.
53. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Delivery Rev* 2006;58:1688-1713.
54. Kumar S, Gokhale R, Burgess DJ. Sugars as bulking agents to prevent nanocrystal aggregation during spray or freeze-drying. *Int J Pharm* 2014;471:303-311.
55. Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *Int J Pharm* 2006;309:178-188.
56. Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;63:87–94.
57. Nakagawa K, Surassmo S, Min SG, Choi MJ. Dispersibility of freeze-dried poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. *J Food Eng* 2011;102:177-188.
58. Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. *Int J Pharm* 2012;439:254-259.
59. Chacon M, Molpeceres J, Berges L, Guzman M, Aberturas MR. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. *Eur J Pharm Sci* 1999;8:99-107.
60. Swarnakar NK, Jain AK, Singh RP, Godugu C, Das M, Jain S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q-10 loaded polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:6860-6874.
61. Dadparvar M, Wagner S, Wien S, Worek F, Briesen HV, Kreuter J. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88:510-517.
62. Zhuang C-Y, Li N, Wang M, Zhang X-N, Pan W-S, Peng J-J et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *Int J Pharm* 2010;394:179-185.

63. Santos SS, Lorenzoni A, Pegoraro NS, Denardi LB, Alves SH, Schaffazick SR et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;116:270-276.
64. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release* 1987;5:37-42.
65. Santos SS, Lorenzoni A, Ferreira LM, Mattiazzi J, Adams AIH, Denardi LB et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. *Mater Sci Eng C* 2013;33:1389-1394.
66. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007;32:762–798.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato

2.1 Apresentação

A aplicação tópica de medicamentos tem por objetivo tratar doenças que acometem a pele, portanto, é essencial que o fármaco fique restrito ao tecido cutâneo evitando que haja efeitos colaterais sistêmicos. Outra característica importante é a eficiência da formulação dermatológica em promover o alcance do fármaco na epiderme e derme para que ocorra o efeito terapêutico esperado (GILMAN et al., 2007). Contudo, o estrato córneo atua como uma barreira frente a penetração de fármacos ou substâncias, desta maneira, a penetração cutânea é um grande desafio no desenvolvimento de formulações tópicas (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

Para modular a permeação cutânea, a associação de fármacos a sistemas nanoestruturados surge como uma alternativa que proporcionaria uma liberação homogênea e protegeria a pele do contato imediato com o fármaco (BOUCHEMAL et al., 2004). As formulações semissólidas são formas farmacêuticas de escolha para a entrega tópica de várias classes de fármacos, pois apresentam vantagens, como a fácil aplicação, rápida preparação (GUPTA; GARG, 2002). Além disso, quando os nanocarreadores são incorporados a essas formulações, proporcionam maior estabilidade aos nanossistemas, podem modificar as propriedades reológicas, controlando a viscosidade, o que influencia na espalhabilidade do produto sob a pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007) e, ainda, promovem maior conforto ao paciente pela redução do número de aplicações (JIMENEZ et al., 2004).

Nesse sentido, no presente capítulo, foi proposta a preparação de géis-creme empregando os pós desenvolvidos no capítulo anterior como produto intermediário. Foram avaliadas a caracterização físico-química das formulações semissólidas e o estudo de permeação/penetração através da pele de porco. Além disso, realizou-se o estudo *in vivo* da eficácia dos géis-creme, através da indução de dermatite de contato.

Desenvolvimento de géis-creme contendo pós liofilizados preparados a partir de nanocápsulas de dipropionato de betametasona e óleo de borragem: estudo de permeação/penetração cutânea e avaliação em modelo experimental de dermatite de contato

Maiara Taís Bazana¹, Paulo Guilherme Rubenich Schimites², Aline Silveira Gonçalves², Jader Betsch Ruchel³, João Felipe P. Rezer¹, Daniela B. Rosa Leal^{1,3}, Cristiane de Bona da Silva¹

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

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

³*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 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

RESUMO

Foram desenvolvidas formulações semissólidas do tipo gel-creme, a partir de produtos secos redispersíveis, obtidos por liofilização, contendo nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas pela associação do óleo de borragem com dipropionato de betametasona. Formulações sem o fármaco, também, foram preparadas e avaliadas para testes comparativos. Os géis-creme apresentaram valores de pH adequado (6,0-6,5) e teor de fármaco próximo ao teórico (0,5 mg/g). Os reogramas exibiram comportamento de fluxo não Newtoniano, seguindo o modelo de Herschel-Bulkley (pseudoplástico) e o perfil de espalhabilidade foi semelhante para as duas formulações. O teste *in vitro* de permeação/penetração em pele de porco indicou que o dipropionato de betametasona é capaz de atingir as diferentes camadas da pele, no entanto, o gel-creme com fármaco não associado foi detectado no meio receptor. Em relação à eficácia *in vivo*, o modelo de dermatite de contato foi capaz de causar dano tecidual comprovada pela avaliação histopatológica, com alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico, as quais participam da modulação da resposta inflamatória e dano oxidativo no fígado e rim dos animais. Entre os diferentes tratamentos, os géis-creme contendo o óleo de borragem e o dipropionato de betametasona nanoestruturados com tratamento alternado foram os que apresentaram melhor eficácia dermatológica, imunológica e redução do dano oxidativo nos tecidos avaliados, comprovando a atividade anti-inflamatória do fármaco e do óleo. Além disso, as formulações com os ativos na forma livre também foram benéficas, sendo efetivas na preservação do dano, porém, na avaliação histológica apresentaram discretas características inflamatórias. O gel-creme contendo o fármaco e o óleo nanoencapsulados com tratamento alternado se mostrou promissor, podendo ser utilizado para o tratamento da dermatite de contato.

Palavras-chave: Dermatite de contato. Dipropionato de betametasona. E-NTPDase. Gel-creme. Nanocápsulas. Óleo de borragem. Permeação/penetração cutânea. Perfil oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A dermatite de contato é uma doença inflamatória de pele, comum, que pode ser induzida pela exposição a agentes químicos de baixo peso molecular, com propriedades pró-inflamatórias e antigênicas (BONNEVILLE et al., 2007). É caracterizada por apresentar eritema pruriginoso intenso, edema, e até mesmo vesículas nos locais de contato do agente na pele. A dermatite de contato alérgica é causada por uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV mediada pela resposta imune das células T, através de um mecanismo de infiltração e ativação de monócitos e/ou macrófagos (KAPLAN; IGYÁRTÓ; GASPARI, 2012).

Medidas farmacológicas frequentemente são usadas, como os glicocorticoides sistêmicos ou tópicos e anti-histamínicos orais (KAPLAN; IGYÁRTÓ; GASPARI, 2012). O corticosteroide, dipropionato de betametasona, possui ação anti-inflamatória, vasoconstritora, antiproliferativa e imunossupressora, sendo empregado no tratamento de doenças de pele (ROCHA; HORTA; SELORES, 2004). No entanto, a utilização de glicocorticoides tópicos pode ocasionar efeitos adversos, como atrofia da pele, acne esteroide, hipopigmentação e até mesmo a dermatite de contato alérgica (HENGGE et al., 2006; ZÖLLER et al., 2008). Com o objetivo de reduzir os efeitos adversos, a nanotecnologia contribui, pelo reduzido tamanho de partícula dos seus nanossistemas, em melhorar a absorção e a concentração terapêutica do fármaco no tecido alvo, permitindo a liberação reprodutível e de longo prazo do fármaco no local de ação, reduzindo a frequência de administração de medicamentos, e melhorar a sua farmacocinética (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Os sistemas nanoestruturados, muitas vezes, são utilizados para o controle da permeação/penetração cutânea de ativos, em testes *in vitro*. Em alguns estudos, observaram que os nanossistemas foram capazes de controlar a permeação das substâncias na pele, retendo-os até a derme, sendo que os ativos na forma não associada foram quantificados no meio receptor, configurando a passagem para a circulação sistêmica (ALVES et al., 2007; LIU et al., 2007; GILLET et al., 2011; SILVA et al., 2013). No caso, os corticosteroides tópicos estão associados a efeitos adversos relacionados à absorção sistêmica (DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005; HENGGE, 2006). Devido a isso, existe uma grande necessidade da descoberta de medicamentos novos e eficazes para o tratamento da dermatite de contato. Assim como, a utilização de produtos naturais, por serem uma fonte excelente de novas substâncias ativas (VUORELA et al., 2004; KATO, 2010).

A busca pelo emprego de óleos de origem vegetal em preparações farmacêuticas e cosméticas deve-se às propriedades emolientes, hidratantes, lubrificantes e, em alguns casos,

aos efeitos terapêuticos (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000). Os óleos e seus produtos ricos em ácido linoleico (ômega-6), tais como o óleo de borragem, auxiliam na função da barreira cutânea da pele e influenciam na resposta inflamatória (BROSCHÉ; PLATT, 2000; FOSTER et al., 2010). O óleo de borragem, obtido da semente do *Borago officinalis L.*, é conhecido por apresentar propriedades anti-inflamatória (FOSTER, et. al., 2010), antioxidante (CONFORTI et al, 2008), antiespasmódica, anti-hipertensiva, antitérmica, afrodisíaca, emoliente, diurética e, também, é considerado útil para o tratamento de asma, bronquite, cólicas, diarreia, palpitações e doenças renais (GILANI; BASHIR; KHAN, 2007).

Considerando a pele como via de administração, a viscosidade do produto final é uma preocupação muito importante. A aplicação de formulações que apresentam uma viscosidade adequada é facilitada, além de evitar a perda do produto. Vários estudos recentes têm produzido veículos semissólidos contendo nanopartículas, facilitando algumas limitações relacionadas com a liberação cutânea das suspensões aquosas de nanopartículas (ALVES et al., 2007; FONTANA et al., 2011; OURIQUE et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; BETONNI et al., 2012; CONTRI et al., 2014).

A partir do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver formulações semissólidas do tipo gel-creme, a partir de produtos secos redispersíveis, obtidos por liofilização, contendo nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas pela associação do óleo de borragem com dipropionato de betametasona. Além disso, foram avaliados os géis-creme quanto às características físico-químicas, permeação/penetração cutânea, perfil oxidativo, a atividade da E-ADA e E-NTPDase em linfócitos de modelo experimental de dermatite de contato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O dipropionato de betametasona (DB) foi obtido da Valdequímica Produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil); o óleo de borragem (OB) foi adquirido da empresa Mundo dos Óleos (Brasília, DF, Brasil); poli(ϵ -caprolactona) - PCL ($M_n = 70.000-90.000$) e monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil); polissorbato 80 (Tween[®] 80) foi comprado da Delaware (Porto Alegre, Brasil); a trealose (Hayashibara, Japão) foi gentilmente fornecida pela Tovani Benzaquen Repr. Ltda (São Paulo, Brasil); o FocusGel[®] 305 foi obtido por doação da Focus Química (São Paulo,

Brasil); imidazolidiniluréia (Cheminol I) adquirido da Fagron (São Paulo, Brasil); sulfato de níquel comprado da Neon Comercial Ltda (São Paulo, Brasil); vaselina sólida adquirida da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); acetonitrila e metanol grau cromatográfico foram obtidos da Tedia (São Paulo, Brasil). Os demais solventes e reagentes foram de grau analítico ou farmacêutico e foram usados como recebidos.

2.2 Preparação das nanocápsulas contendo óleo de borragem e dipropionato de betametasona e seus respectivos pós desidratados

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem e dipropionato de betametasona (DB-NC_{OB}) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado na concentração de 0,25 mg/mL de betametasona e 2% de óleo de borragem, como descrito previamente. Após preparação, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). O teor de fármaco foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a preparação dos pós liofilizados, a trealose (10%, m/v) foi misturada com as suspensões contendo ou não o fármaco (DB-NC_{OB} e NC_{OB}, respectivamente) sob agitação magnética por 20 minutos. A amostra foi submetida à liofilização em liofilizador (LIOTOP 101, Liobras, São Paulo, Brasil) para obter os respectivos produtos secos (L-DB-NC_{OB} e L-NC_{OB}). O teor de fármaco dos produtos secos foi obtido por CLAE. As condições detalhadas dos procedimentos e análises estão descritas no capítulo 1.

2.3 Preparação e caracterização físico-química das formulações semissólidas

2.3.1 Preparação dos géis-creme

Os géis foram preparados em triplicata com auxílio de gral e pistilo. A base semissólida do tipo gel-creme foi preparada contendo como polímero espessante líquido e estabilizante aniônico poliacrilamida e isoparafina C13-14, álcool laurílico etoxilado 7 (FocusGel[®] 305) (2 g), imidazolidiniluréia (0,5 g) como conservante e água ultrapura (q.s.p. 100 g). Nesta base, os produtos secos (28,08 g) foram incorporados, resultando em uma concentração de 0,5 mg/g de betametasona (GCL-DB-NC_{OB}). Formulações sem o fármaco (GCL-NC_{OB}) também foram preparadas. Os géis-creme foram acondicionados em frascos plásticos de parede dupla, armazenados à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e as análises em relação as suas características físico-químicas foram realizadas 24 h após a sua preparação.

2.3.2. Caracterização físico- química dos géis-creme

O pH das formulações foi determinado em potenciômetro (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil) previamente calibrado com soluções tampão de 4,0 e 7,0. As amostras foram diluídas em água destilada, na concentração de 10% (p/p).

A determinação do diâmetro médio de partículas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano series, ZEN 3600, Malvern Instruments, UK), após redispersão de uma alíquota do gel-creme em água ultrapura, na proporção de 1:500 (m/v) e filtrada em filtro quantitativo (28 μm) para posterior determinação.

A quantificação do fármaco nos géis-creme foi realizada por CLAE, de acordo com as condições experimentais descritas no capítulo 1. Uma alíquota (0,8 g) de cada gel-creme foi transferida para balão volumétrico (20 mL) contendo metanol e a extração do fármaco foi realizada por 30 minutos, sob agitação magnética. Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e filtradas em membrana de nylon (0,45 μm) para posterior análise.

A espalhabilidade das formulações semissólidas foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Borguetti e Knorst (2006) e modificada por Rigo e colaboradores (2012). Na qual, 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, retirou-se a placa molde e placas de vidro de peso conhecido foram depositadas, individualmente, sob a amostra em intervalos de um minuto. Em cada tempo de análise, a imagem obtida foi capturada com auxílio de digitalizador. O software ImageJ (Versão 1.47, National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para calcular as áreas obtidas a partir das imagens digitalizadas. 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 (mm^2/g) = fator de espalhabilidade

A = área máxima de espalhabilidade

P = peso total adicionado

As formulações foram avaliadas em relação as suas propriedades reológicas com o auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield modelo LVDVII+ Pro (Middleborough, Estados

Unidos), com adaptador para pequenas amostras e sensor de cisalhamento SC4-25, acoplado a um banho de água termostaticado circular para controle da temperatura em 25 ± 1 °C. Cinco pontos diferentes foram registrados (0,044 a $0,22 \text{ s}^{-1}$), em intervalos de dois minutos. Os resultados foram analisados com auxílio do software Rheocalc (V3.1-1 versão, Brookfield Instruments, UK), a fim 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 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.

2.4 Avaliação da permeação/penetração cutânea *in vitro* do fármaco a partir dos géis-creme

O estudo da permeação/penetração do fármaco foi realizado através da pele abdominal de porco doado de abatedouro local (Santo Ângelo/ Brasil), empregando célula de difusão do tipo de Franz. Os pelos foram delicadamente cortados com auxílio de tesoura e a pele foi lavada com água destilada fria e seca com papel macio. A espessura total da pele foi medida ($1,48 \pm 0,09$ mm), cortada em círculos adequados de acordo com o tamanho do compartimento da célula e posteriormente armazenada em freezer a -20 °C até o momento do uso. As células de Franz usadas possuíam um diâmetro de superfície de 1,77 cm e uma capacidade de sete mL. O fluido receptor foi composto de água:etanol (70:30), o qual foi escolhido de acordo com a solubilidade do dipropionato de betametasona. Para comparação, um creme-gel contendo o DB não associado ao nanocarreador (GC_{OB}-DB) foi, também, preparado. Uma alíquota de 500 mg de cada formulação (GCL-DB-NC_{OB} e GC_{OB}-DB) foi aplicada na superfície da pele. As células ($n = 9$ /formulação) foram mantidas em agitação contínua do fluido receptor por 8 h em banho de água com termostato à temperatura de $32 \pm 0,5$ °C. Após este período, a quantidade de formulação em excesso foi removida e a distribuição do DB na pele foi avaliada. A concentração do fármaco nas diferentes camadas da pele e no compartimento receptor foi determinada por CLAE segundo condições cromatográficas validadas durante o estudo.

O estrato córneo foi removido da epiderme viável a partir de 18 sucessivas retiradas com fita adesiva (*tape stripping*) e a epiderme viável foi separada da derme por aquecimento da pele à 60 °C em banho de água, por 1 minuto. O fármaco foi extraído das camadas da pele com acetonitrila, agitação em vórtex por 2 min, seguido por 15 min de ultrassom.

2.5 Avaliação da eficácia *in vivo*

2.5.1 Animais

Para o ensaio foram utilizados 40 ratos *Wistar* fêmeas, convencionais e heterogênicos (200-250g), com idade média de seis semanas, separados em oito grupos de cinco animais cada. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro natural de 12 h e em sala com controle de temperatura de 20-25 °C, com água e ração padrão *Ad libitum*, oriundos do biotério da Universidade Federal de Santa Maria. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFSM, de acordo com o parecer nº 126/2014.

2.5.2 Ensaio de dermatite de contato

A indução da dermatite de contato foi realizada com aplicação tópica de sulfato de níquel a 5%, utilizando vaselina sólida como veículo (BRUM et al., 2009). Após tricotomização, todos os grupos, exceto o primeiro, foram sensibilizados com sulfato de níquel no abdômen. Após seis dias da sensibilização, a indução foi realizada com cinco aplicações em cada orelha em intervalos de 72 h. Todos os géis-creme com o fármaco em sua composição possuíam o equivalente a 0,5 mg/g de betametasona. Os animais foram divididos em oito grupos, conforme demonstrado abaixo:

Grupo 1 (C): controle, somente sensibilizado com vaselina sólida;

Grupo 2 (DC): dermatite de contato, induzida com 5% de NiSO₄ dissolvido em vaselina sólida;

Grupo 3 (GC_{OB}): DC tratado com gel-creme com o OB não associado às nanocápsulas;

Grupo 4 (GC_{OB}-DB): DC tratado com gel-creme com o OB e o DB não associados às nanocápsulas;

Grupo 5 (GCL-DB-NC_{OB}): DC tratado com gel-creme com produto liofilizado nanoparticulado contendo o OB e o fármaco;

Grupo 6 (GCL-DB-NC_{OB} A): DC tratado com gel-creme com produto liofilizado nanoparticulado contendo o OB e o fármaco (tratamento em dias alternados);

Grupo 7 (GCL-NC_{OB}): DC tratado com gel-creme com produto liofilizado nanoparticulado contendo o OB, sem o fármaco;

Grupo 8 (GC): DC tratado com gel-creme base.

Os grupos tratados receberam a aplicação diária das formulações por cinco dias, com exceção do grupo 6, o qual foi tratado em dias alternados, totalizando cinco aplicações (dias

1, 3, 5, 7 e 9). Todos os géis-creme foram aplicados de maneira uniforme nas orelhas através de massagem, a fim de obter uma melhor penetração. Todos os animais, após 72 h da última aplicação, sofreram eutanásia e o sangue foi coletado por punção cardíaca para determinar a atividade da E-NTPDase em linfócitos, seguido da retirada do fígado e dos rins para avaliação do estresse oxidativo, e das orelhas para análise histológica.

2.5.3 Formulações semissólidas

Para a realização desse ensaio foram preparados diferentes tipos de formulações (géis-creme) a fim de se obter uma melhor comparação entre os grupos. Segue abaixo a tabela quali-quantitativa com os componentes de cada formulação (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa dos géis-creme utilizados na avaliação da eficácia *in vivo* em modelo de dermatite de contato

Componentes	GC _{OB}	GC _{OB} -DB	GCL-DB-NC _{OB} ou GCL-DB-NC _{OB} A	GCL-NC _{OB}	GC
DB	0,064 g	0,064 g	-	-	-
OB	3,66 g	3,66 g	-	-	-
FocusGel 305	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Imidazolidiniluréia	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Tween 80	1,53 g	1,53 g	-	-	1,53 g
L-DB-NC _{OB}	-	-	28,08 g	-	-
L-NC _{OB}	-	-	-	28,08 g	-
Trealose	22,88 g	22,88 g	-	-	22,88 g
H ₂ O ultrapura q.s.p.	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g

2.5.4 Avaliação histopatológica

As amostras de tecido *ex vivo* da orelha das ratas foram recolhidas e fixadas em solução de formol a 10% e, em seguida, desidratadas e embebidas em parafina. Após, foi realizado o seccionamento e coloração histológica com hematoxilina e eosina. As lâminas foram observadas em um microscópio óptico para verificar possíveis alterações no tecido da orelha indicativos da indução da dermatite de contato.

2.5.5 Determinação da atividade das ecto-enzimas E-NTPDase e adenosina deaminase (E-ADA)

2.5.5.1 Isolamento de Células Mononucleares de sangue periférico

As ratas foram anestesiadas com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi coletado com 7,2 mg de EDTA dipotássico como anticoagulante e as células mononucleares ricas em linfócitos foram isoladas a partir do sangue coletado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e separados em Ficoll-Histopaque em gradientes de densidade (BÖYUM, 1968). A percentagem de linfócitos foi superior a 93%, tal como previamente descrito (JAQUES et al., 2011).

2.5.5.2 Determinação do conteúdo proteico

O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Coomassie Blue, usando albumina bovina como padrão, conforme descrito por Bradford (1976).

2.5.5.3 Hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase em linfócitos

Após isolamento das células mononucleares, a hidrólise dos nucleotídeos foi determinada pela medida de fosfato inorgânico liberado na reação usando o método colorimétrico (CHAN; DELFER; JUNGER, 1986) e padronizado em linfócitos (LEAL et al., 2005). O meio de reação continha 0,5 mM de CaCl_2 , 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de glicose e 50 mM de Tris-HCl, em pH de 8,0 em um volume final de 200 μL . Vinte microlitros de suspensão salina contendo células mononucleadas intactas totalizaram a concentração média de 2-4 μg de proteínas e foram pré-incubadas por 10 min., a 37 °C. A reação foi iniciada por adição de substrato (ATP ou ADP) a uma concentração final de 2 mM e as amostras foram incubadas por 70 min a 37 °C, e finalizadas com 200 μL de ácido tricloroacético a 10%, totalizando uma concentração de 5%. As amostras foram resfriadas por 10 minutos antes da análise da liberação do fosfato inorgânico (Pi), a 37 °C, usando verde de malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. As amostras foram analisadas em triplicata para avaliar a atividade específica em nmol do Pi liberado/mim/mg de proteína.

2.5.5.4 Atividade da E-ADA

A determinação da E-ADA foi realizada espectrofotometricamente em linfócitos pelo método de Giusti e Galanti (1984), que se baseia na medição direta da formação de amônia produzida, quando E-ADA atua em excesso de adenosina. Resumidamente, 25 μL de linfócitos reagem com 21 mM do substrato (adenosina), pH 6,5, e a incubação foi realizada durante 1 h, à 37 °C. A reação foi parada pela adição de 106 mM de nitroprussiato de sódio e 167,8 mM de solução de hipoclorito. Sulfato de amônia 75 μM foi utilizado como padrão de

amônia. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em U/L para a atividade de ADA. Uma unidade (1 U) de E-ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amoníaco por minuto a partir de adenosina em condições padrão de ensaio.

2.5.6 Homogeneização dos tecidos

Uma pequena fração dos tecidos hepático e renal foi homogeneizada na proporção de (1:10, m/v) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e então centrifugada à 2000 rpm, por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a realização dos testes de estresse oxidativo.

2.5.7 Perfil oxidativo

2.5.7.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada nos tecidos renal e hepático, como descrito por Ohkawa e colaboradores (1979), cujo objetivo é medir a formação de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação de ácidos graxos, que quando aquecido na presença de ácido tiobarbitúrico, forma um composto rosado que pode ser medido espectrofotometricamente. Em resumo, 200 µL do sobrenadante do tecido homogeneizado (1:10) da amostra foram adicionados a 500 µL de ácido acético 2,5 M pH 3,4; 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8%, 200 µL de dodecil sulfato de sódio 8,1% (SDS) e 100 µL de água destilada. Posteriormente, foram aquecidos em banho-maria durante 120 minutos e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 532 nm e expressa em equivalentes de MDA (nmol MDA/mL).

2.5.7.2 Dosagem dos grupamentos tióis não protéicos (NPSH)

A dosagem dos grupamentos SH não proteicos (NPSH) foi realizado nos tecidos renal e hepático de acordo com o método descrito por Ellman (1959). Em resumo, uma alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado (1:10) foi diluída com 10% de ácido tricloroacético (TCA), e em seguida centrifugada a 2000 rpm, por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante reage com 250 µM de DTNB em um volume final de 2 mL, e a absorbância foi determinada em 412 nm. Uma curva padrão com cisteína 0,5 mM foi construída, a fim de calcular a concentração dos grupos sulfidrilas totais nas amostras.

2.5.7.3 Ensaio da catalase (CAT)

Para determinar a atividade da CAT, o sobrenadante dos tecidos renal e hepático, homogeneizados (1:10), foi diluído à 1:60. A atividade enzimática foi determinada pela degradação de H₂O₂ medida em um comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima catalase foi determinada seguindo o método espectrofotométrico de Nelson e Kiesow (1972).

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla Tukey para os testes de reologia, espalhabilidade e permeação/penetração; Newman-Keuls (perfil oxidativo e antioxidante); e Dunnett's (E-NTPDase e E-ADA). Considerando um nível de significância para os valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química dos géis-creme

Os géis-creme contendo o pó liofilizado com nanopartículas apresentaram coloração branca, aspecto homogêneo e odor característico. Na tabela 2 encontram-se os resultados obtidos na determinação do tamanho médio de partículas, polidispersão, pH e teor de fármaco para os géis-creme contendo os produtos secos das nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona (GCL-DB-NC_{OB}) e dos mesmos sem o fármaco (GCL-NC_{OB}). A formulação com fármaco demonstrou teor próximo ao teórico (0,50 mg/g) e todas as formulações apresentaram pH em torno de 6,3, compatível com a aplicação tópica (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006), não se observando mudanças em relação às suspensões aquosas (NC_{OB} = $6,29 \pm 0,15$ e DB-NC_{OB} = $6,35 \pm 0,18$). 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. Em outro estudo, 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). Em relação ao tamanho médio de partículas após dispersão dos géis-creme em água, foi observado que se mantiveram na escala nanométrica, porém, com valores maiores que as suspensões originais e seu produto

liofilizado ($NC_{OB} = 198 \pm 10$ nm; $L-NC_{OB} = 222 \pm 31$ nm ; $DB-NC_{OB} = 197 \pm 05$ nm e $L-DB-NC_{OB} = 236 \pm 23$ nm). Este aumento pode ser devido à presença dos componentes do FocusGel e dos demais presentes na formulação (trealose, tween 80 e imidazolidiniluréia), uma vez que o gel base apresentou tamanho de partícula de 367 ± 53 nm e PdI de $0,38 \pm 0,07$, dificultando a adequada dispersão da formulação em água, facilitando a agregação das nanopartículas (SANNA et al., 2010).

Tabela 2- Características físico-químicas dos géis-creme contendo os produtos liofilizados a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas pela associação do DB e OB (média \pm desvio padrão, n=3)

Formulações	Teor de fármaco (mg/g)	Tamanho de partícula (nm)	PdI	pH
GCL- NC_{OB}	-	331 ± 20	$0,40 \pm 0,03$	$6,36 \pm 0,18$
GCL- $DB-NC_{OB}$	$0,50 \pm 0,02$	312 ± 55	$0,39 \pm 0,04$	$6,32 \pm 0,20$

Características importantes para aplicação tópica, também, foram avaliadas a viscosidade, comportamento reológico e espalhabilidade das formulações semissólidas. As propriedades reológicas de preparações estão diretamente relacionadas ao enchimento e à remoção do produto no envase, à sua espalhabilidade e aderência à pele, ao uso pelo paciente e à estabilidade do produto (SINKO, 2006).

Os reogramas dos géis-creme contendo os produtos secos nanoestruturados foram obtidos através da representação gráfica da tensão de cisalhamento *versus* velocidade de cisalhamento (Figura 1). A partir dos resultados pode-se observar que todas as formulações apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano, uma vez que não se verificou uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento aplicada, característico de sistemas semissólidos. Além disso, todos os géis-creme se encaixaram ao modelo de Herschel-Bulkley ($r > 0,98$; $n < 1$), o qual descreve o comportamento pseudoplástico dos mesmos, e diferenças significativas não foram verificadas entre as formulações ($p > 0,05$). Estes sistemas demonstram uma diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (KIM et al, 2003).

A análise dos reogramas indicou que os géis-creme não apresentaram tixotropia, pois não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pontos ascendentes e descendentes das curvas obtidas. Este fenômeno se caracteriza pela presença de um *loop* de histerese (área

entre as curvas ascendente e descendente) calculada através do reograma de tensão *versus* velocidade de cisalhamento (MEWIS; WAGNER, 2009).

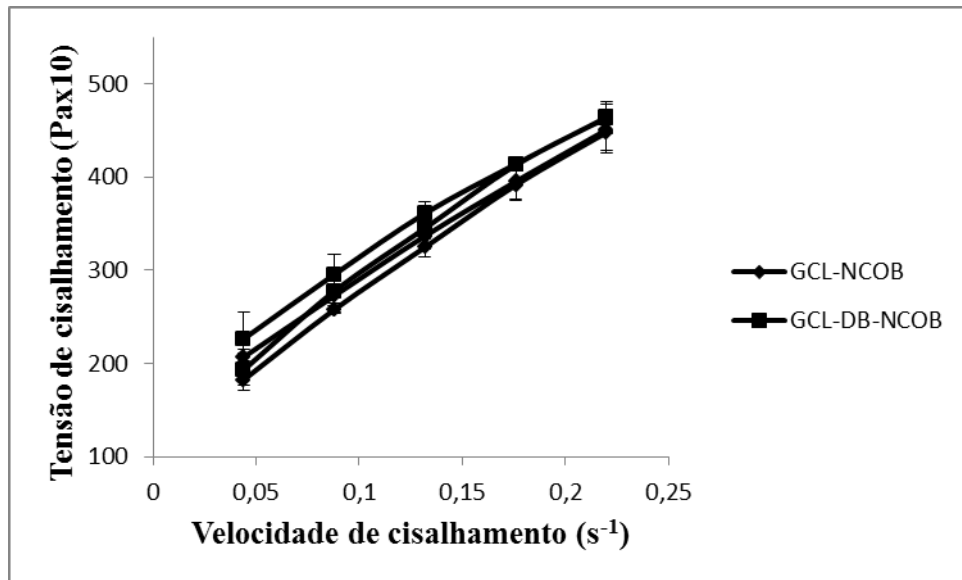


Figura 1 - Reograma dos géis-creme contendo produto seco das nanocápsulas de óleo de borragem (GCL-NC_{OB}) e nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona (GCL-DB-NC_{OB}), (n=3).

A espalhabilidade avalia o comportamento da formulação após certa força aplicada e está relacionada com a aplicação da mesma 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 e os valores obtidos foram: GCL-DB-NC_{OB}, FE= $7,15 \pm 0,21 \text{ mm}^2/\text{g}$ e GCL-NC_{OB}, FE = $7,16 \pm 0,21 \text{ mm}^2/\text{g}$. De acordo com os resultados, podemos observar que as duas formulações apresentam perfis de espalhabilidade semelhantes (Figura 2), corroborando com os obtidos na viscosidade, em que diferenças não foram observadas entre as amostras ($p > 0,05$).

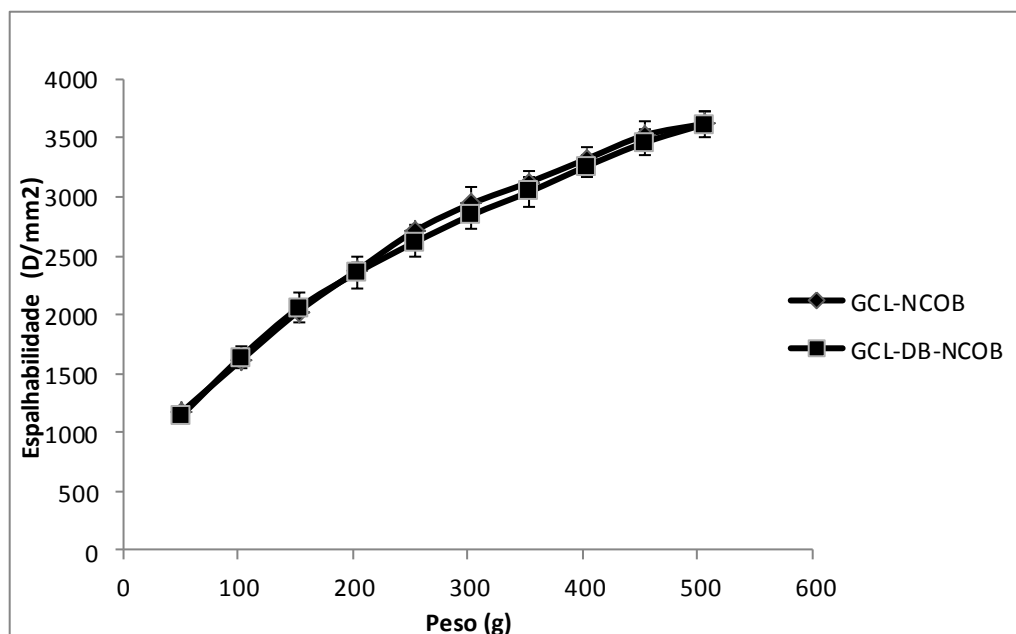


Figura 2 - Representação gráfica da espalhabilidade dos géis-creme contendo produto seco das nanocápsulas de óleo de borragem (GCL-NC_{OB}) e nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona (GCL-DB-NC_{OB}), n=3.

3.2 Permeação/penetração cutânea *in vitro*

Células do tipo Franz foram usadas para avaliar a permeação/penetração do DB a partir dos géis-creme contendo o produto liofilizado das nanocápsulas de OB e fármaco (GCL-DB-NC_{OB}) e géis-creme com OB e DB não associados (GC_{OB}-DB) utilizando como barreira a pele do abdômen de porco. A quantidade de fármaco retido na pele foi determinado separadamente no estrato córneo, epiderme viável e derme, e a possível capacidade de penetração no meio receptor, também, foi verificada. Ambas formulações permearam pelas diferentes camadas da pele, no entanto, somente o GC_{OB}-DB foi quantificado no meio receptor, após 8 h de experimento. A maior concentração de fármaco foi encontrada no estrato córneo, porém, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as quantidades detectadas para GCL-DB-NC_{OB} e GC_{OB}-DB. Assim como, menores quantidades foram detectadas na epiderme e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os géis-creme. Ambas formulações foram capazes de permear através da pele e menores quantidades de betametasona ($p < 0,05$) ficaram retidas na derme com o gel-creme nanoestruturado (GCL-DB-NC_{OB}), o que pode indicar que níveis mais baixos de fármaco estão disponíveis para absorção sistêmica, uma vez que a derme é vascularizada (Figura 3).

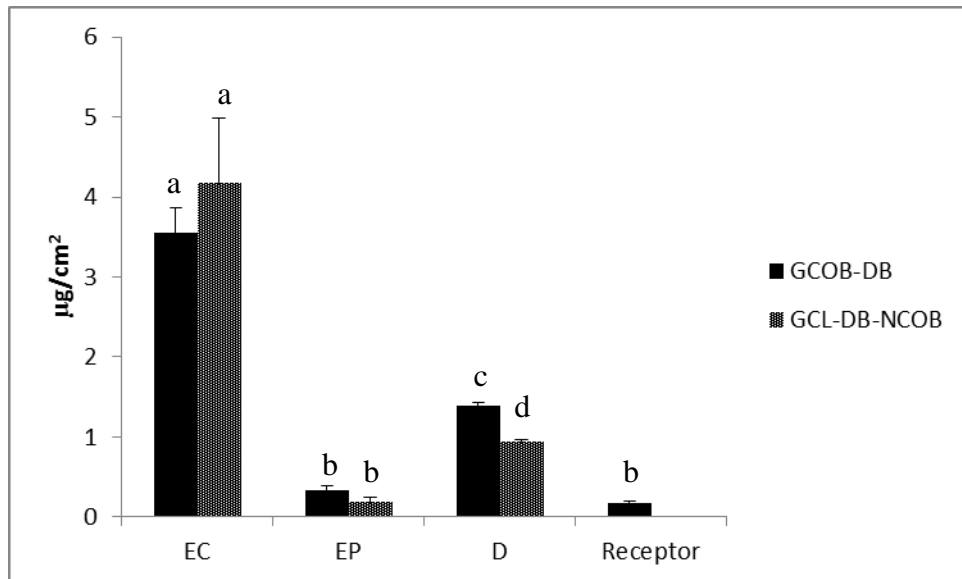


Figura 3 - Distribuição da betametasona a partir do gel-creme contendo DB e OB não associados às nanocápsulas (GCOB-DB) e do gel-creme nanoestruturado (GCL-DB-NCOB) no estrato córneo (EC), epiderme (EP), derme (D) e no meio receptor, verificada no estudo de permeação/penetração cutânea com células de Franz, após 8 h.

A absorção de fármacos na pele é afetada por vários fatores, tais como espessura, temperatura, grau de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, raça, pH na superfície da pele e integridade do estrato córneo (WOKOVICH et al., 2006). Além disso, características físico-químicas do fármaco e do veículo, solubilidade do fármaco no veículo e as condições fisiológicas da pele influenciam na absorção percutânea de fármacos aplicados por via tópica (SHAH et al., 1992; WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; PARISER, 2009; HOSSAIN; AHMED; PLAKOGIANNIS, 2012; NAGELREITER et al., 2013). Os corticosteróides tópicos para serem terapêuticamente eficazes devem penetrar na pele e atingir a epiderme e a derme, locais de ação desses medicamentos (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; PARISER, 2009). O potencial do fármaco a ser absorvido na circulação sistêmica, provavelmente está relacionado a quantidade de fármaco retida nas diferentes camadas da pele (PARISER, 2009). Os corticosteróides tópicos estão associados a diversos efeitos colaterais, os quais incluem reações de pele localizadas que ocorrem no local da aplicação e efeitos adversos relacionados a absorção sistêmica (DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005; HENGGE, 2006). Neste trabalho, a formulação com o fármaco e o óleo livre apresentou maior permeação, sendo detectada no meio receptor, isso pode ser característico do DB quando se encontra na forma livre, como já foi observado por Gillet e

colaboradores (2011) que avaliaram a formulação comercial na forma farmacêutica do tipo loção (Diprosone[®]). Da mesma forma, o fármaco foi quantificado no meio receptor, porém, quando se empregou lipossomas contendo o DB, este somente foi detectado até a derme, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Em outro estudo, Liu e colaboradores (2007) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas de isotretinoína e aplicaram-na topicamente. O estudo de permeação *in vitro* mostrou que quantidades semelhantes de fármaco foram encontradas no estrato córneo tanto a partir da aplicação das nanopartículas, quanto do fármaco livre, no entanto, a inclusão da isotretinoína nesse nanocarreador foi capaz de evitar a captação sistêmica do fármaco, mostrando-se promissora nesse sentido.

Alves e colaboradores (2007) avaliaram diferentes nanocarreadores contendo a nimesulida, os quais foram incorporados em géis hidrofílicos e observaram que as nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões permearam até a epiderme/derme, demonstrando que os nanossistemas são capazes de evitar a passagem do fármaco para o meio receptor. Silva e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico contendo vitamina K1, as quais ficaram retidas nas camadas da pele, em maior concentração no estrato córneo, e a formulação controle foi quantificada no meio receptor. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os encontrados na literatura, comprovando que as nanoestruturas possuem o potencial em controlar a permeação de ativos na pele, retendo-os até a derme.

3.3 Avaliação da eficácia *in vivo* em modelo experimental de dermatite de contato

No exame histológico pode-se observar que o grupo controle não apresentou alterações inflamatórias (Figura 4 A), enquanto no grupo sensibilizado foi encontrado congestão vascular (eritema), presença de edema na derme, infiltrado inflamatório com presença de leucócitos na derme, espessamento da camada espinhosa e descamação do estrato córneo (Figura 4B), o que comprovou a eficácia do protocolo de indução proposto. Segundo Pereira e colaboradores (2001) esses parâmetros estão de acordo com os do diagnóstico de dermatite de contato. Quando analisamos os grupos tratados, podemos observar que o grupo tratado com GC_{OB} não apresentou alterações inflamatórias, mas mostrou discreta descamação na camada córnea e redução do edema (Figura 4C). No grupo GC-DB_{OB}, também houve ausência de processo inflamatório com pouca descamação, e foi observado retificação da

epiderme (Figura 4D), a qual sugere o início da atrofia. De acordo com Shoepe e colaboradores (2006) o uso tópico de corticosteroides pode provocar atrofia da pele. Brum e colaboradores (2009) quando utilizaram dexametasona livre como tratamento do mesmo experimento de dermatite de contato, também, verificaram atrofia da epiderme. Já quando, foi utilizado o gel-creme com associação dos ativos nanoestruturados em dias alternados (GCL-DB-NC_{OB} A) não houve atrofia da camada espinhosa e alterações inflamatórias e houve pouco edema, mostrando-se um tratamento eficaz (Figura 4F). Os grupos GCL-DB-NC_{OB} e GCL-NC_{OB} apresentaram melhora na dermatite, mas com algumas alterações ainda presentes, conforme as Figuras 4E e 4G. Os animais tratados com gel-creme base não obtiveram melhora, apresentando congestão vascular com células inflamatórias, edema na derme, presença de leucócitos na derme e nos vasos e descamação da pele (Figura 4H). Assim, a partir da avaliação histopatológica foi possível observar que o tratamento com GCL-DB-NC_{OB} foi capaz de reverter as alterações inflamatórias presentes durante a dermatite de contato.

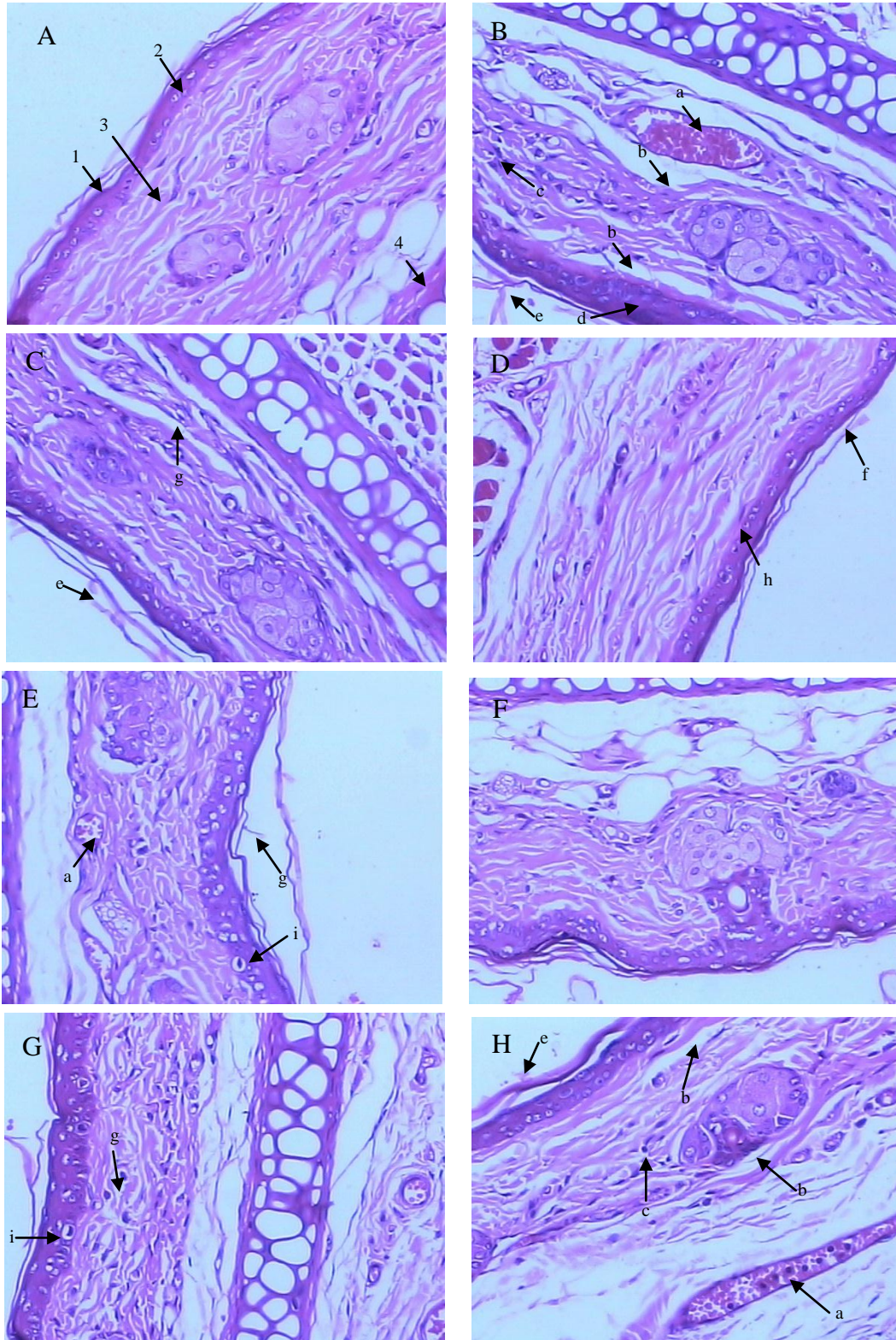


Figura 4- Imagens histológicas das orelhas de ratas dos animais de diferentes grupos corados com hematoxilina e eosina. (A) grupo controle. (B) dermatite de contato. (C) Animais tratados com GC_{OB}. (D) Animais tratados com GC-DB_{OB}. (E) Animais tratados com GCL-DB-NC_{OB}. (F) Animais tratados com GCL-DB-NC_{OB} A. (G) Animais tratados com GCL-NC_{OB}. (H) Animais tratados com GC. Setas: 1) camada córnea; 2) camada escamosa; 3) derme; 4) vaso sanguíneo; a) congestão vascular; b) edema na derme; c) leucócitos; d) espessamento da camada espinhosa; e) descamação do estrato córneo; f) discreta descamação do estrato córneo; g) redução do edema h) retificação da epiderme i) edema nas células da epiderme. Aumento de 200X.

Determinação da atividade da E-NTPDase e da E-ADA

A primeira NTPDase identificada foi a NTPDase-1, como proteína CD39, que está ancorada à membrana via dois domínios transmembrana e que hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP em proporções semelhantes (ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase-1 é um marcador de ativação de linfócitos, sendo também expressa em células natural killer, monócitos, células dendríticas e em um subconjunto de células T ativadas. Através da modulação da sinalização purinérgica a enzima desempenha um papel importante no controle da resposta imune celular (DEAGLIO et al., 2007; ROBSON et al., 2006; DWYER et al., 2007; MIZUMOTO et al., 2002). Avaliou-se a hidrólise de nucleotídeos da adenina, pela E-NTPDase em linfócitos de ratos com dermatite de contato sem e com tratamento, sendo que a enzima E-NTPDase serve como marcador de ativação linfocitária.

Os resultados no presente estudo mostraram um aumento na atividade da E-NTPDase no grupo com dermatite de contato em comparação com o grupo controle, corroborando com os resultados encontrados na literatura com a utilização deste protocolo (BRUM et al., 2009; FONTANA et al., 2011). O aumento da atividade de E-NTPDase conduz à hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP, como um mecanismo de compensação, mantendo os seus níveis adequados, pois o ATP liberado para o meio extracelular em altas concentrações ativa os receptores P2X7 pró-inflamatórios purinérgicos e contribui para danos nos tecidos e inflamação (DI VIRGILIO, 1995). Assim, os resultados aqui descritos sugerem a presença de processo inflamatório de hipersensibilidade, onde há ativação dos linfócitos T, provavelmente responsáveis pela atividade aumentada da enzima, que de acordo com outros trabalhos são desencadeados por agentes irritantes, como na dermatite de contato. Estes trabalhos sugerem que respostas inflamatórias resultam da liberação de ADP e ATP pela sensibilização dos queratinócitos, funcionando como mediadores pró-inflamatórios, ativando os linfócitos T. Esse processo seria regulado pelo CD39 através da hidrólise do ATP e ADP em AMP (KÜNZLI et al., 2008) (Figura 5).

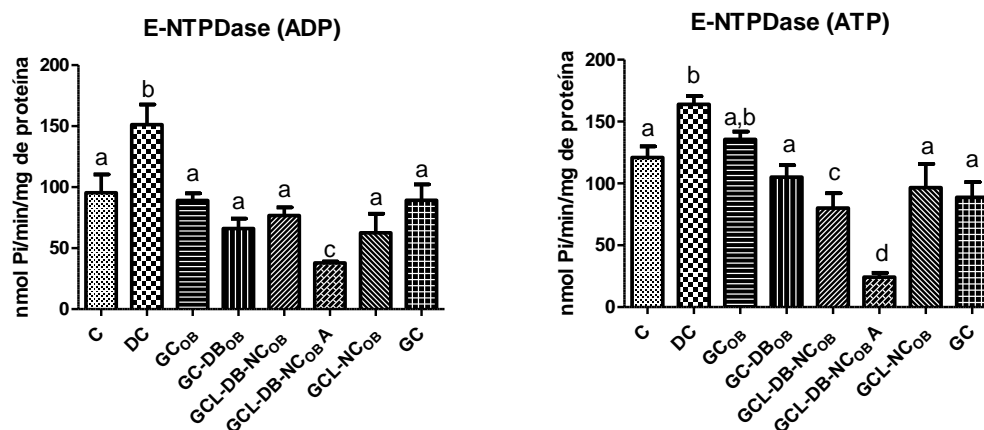


Figura 5 - Hidrólise do ADP e ATP pela E-NTPDase em linfócitos nos grupos C, grupo controle; DC dermatite de contato; GC_{OB}, DC tratado com óleo livre; GC-DB_{OB}, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NC_{OB}, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado; GCL-DB-NC_{OB} A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GCL-NC_{OB}, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. Amostras incubadas por 70 minutos a 37 °C. As barras representam à média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett's ($p < 0,05$) para letras diferentes, ($n = 5$).

Nos grupos com dermatite de contato tratados com os diferentes tipos de géis-creme pode-se observar que estes não apresentaram diferença em relação ao grupo controle e o GC_{OB} também não apresentou diferença em relação ao grupo dermatite. Além disso, com os grupos GCL-DB-NC_{OB} A e GCL-DB-NC_{OB} a associação do óleo de borragem e do dipropionato de betametasona nos sistemas nanoestruturados, reduziu a atividade da E-NTPDase. No entanto, sabe-se que, a maior atividade da E-NTPDase pode ser estimulada por um aumento na concentração do ATP extracelular, o que pode ocorrer durante o processo inflamatório. Deste modo, para esses tratamentos foi observado o contrário, nos quais os níveis de ATP estavam diminuídos e de ADP foram reduzidos para o GCL-DB-NC_{OB} A e iguais ao controle para o GCL-DB-NC_{OB}. Os baixos níveis de sinalização purinérgica induzido pelo decréscimo das concentrações de nucleotídeos, modulam respostas inflamatórias e imunes pelos receptores P2 (DI VIRGILIO et al., 2003). Em baixas concentrações, o ATP extracelular possui afinidade para o subtipo do receptor P2Y nas superfícies de linfócitos. Estes receptores purinérgicos, quando estimulados, desenvolvem uma baixa modulação de citocinas pró-inflamatórias e estimulam a resposta imune Th2,

levando à produção de citocinas anti-inflamatórias, a proteção de danos oxidativos e a baixa produção de radicais de oxigênio no sangue total (BOURS et al, 2006).

A E-ADA é uma enzima essencial para a proliferação e diferenciação dos linfócitos e monócito-macrófago no sistema imune, e alterações em sua atividade têm sido consideradas um indicador de distúrbios imunológicos (HITOGLU et al., 2001; POURSHARIFI et al., 2009). Na Figura 6, pode-se observar que o grupo com dermatite de contato apresentou maior atividade da enzima. Já para os grupos tratados foi observado uma diminuição, mostrando-se semelhantes ao grupo controle. O grupo tratado com GC-NC_{OBDB} A apresentou uma diminuição significativa $p < 0,05$ em relação ao controle. Sendo assim, todos os tratamentos revertem a atividade aumentada da enzima ou previnem.

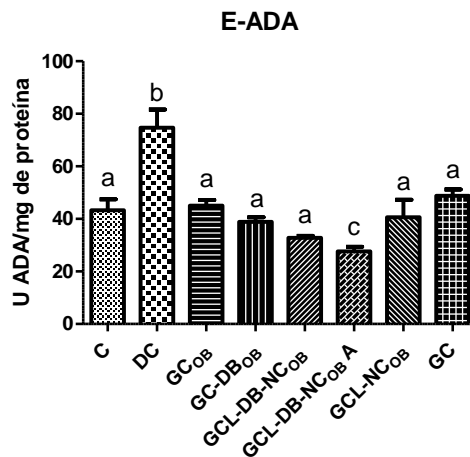


Figura 6 - Atividade da E-ADA em linfócitos de ratas nos grupos C, controle; DC dermatite de contato; GC-OB, DC tratado com óleo livre; GC-OBDB, DC tratado com óleo e fármaco livre; GC-NC_{OBDB}, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-NC_{OBDB} A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NC_{OB}, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC-B, DC tratado com gel-creme base. As barras representam à média \pm EPM de U E-ADA/ mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett's ($p < 0,05$) para letras diferentes, ($n = 5$).

Perfil oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como espécies reativas de nitrogênio (ERNs), somando-se a deficiência concomitante das defesas antioxidantes do corpo (VALKO et al., 2007; NAKAI; YONEDA; KUBOTA, 2012). Na dermatite alérgica de contato foram encontrados, os níveis sistêmicos elevados de interleucina (IL)-6, IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α

(CAVANI; DE PITÀ; GIROLOMONI, 2007; ALBANESI, 2010). As EROs têm sido propostas por participarem da sensibilização inicial do alérgeno, bem como, do desenvolvimento de respostas alérgicas patogênicas (CORSINI et al., 2013).

A exposição da pele a agentes ambientais físicos e químicos induz o estresse oxidativo levando à indução da peroxidação lipídica cutânea com concomitante modulação dos níveis de antioxidante e enzimas que metabolizam fármacos (BICKERS; ATHAR, 2006). A lipoperoxidação é causada por radicais que reagem com lipídios formando hidro ou lipoperóxidos que são altamente reativos e podem seguir uma cascata oxidativa, liberando produtos como o malondialdeído (MDA). A quantificação de tal composto por reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) tem sido utilizada para avaliar o dano oxidativo (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Desta forma, o biomarcador comumente utilizado na peroxidação lipídica é o MDA (JENTZSCH et al., 1996; GROTTTO et al., 2008). Níveis aumentados de MDA são conhecidos como sendo relacionados com a instabilidade da membrana plasmática devido a geração de SROs e SRNs.

A liberação descontrolada de EROs está envolvida na patogênese de várias desordens da pele humana, incluindo neoplasias cutâneas (BRIGANTI; PICARDO, 2003; BLACK, 2004). Esser e colaboradores em 2012 comprovaram que EROs podem estar envolvidas em doenças inflamatórias de pele. Nesse sentido, os modelos animais têm sido amplamente utilizados no estudo de dermatite de contato alérgica (DCA), onde o DNFB (2,4-dinitrofluorobenzeno) é o hapteno mais utilizado, que pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (Kim et al., 2009). O sulfato de níquel, também já foi usado como indutor de dermatite de contato (BRUM et al., 2009). O estresse oxidativo pode enfatizar a reação inflamatória, e, em seguida, formar um ciclo vicioso. Em outro estudo sugeriram que o desequilíbrio na razão de GSH / GSSG [glutationa reduzida (GSH) versus a forma de glutationa oxidada (GSSG)] desempenha um papel crucial em DCA (MIZUASHI et al., 2005). Indicando que antioxidantes podem ser benéficos para o tratamento da doença, como é o caso do óleo de borragem.

Na hipersensibilidade cutânea há duas fases distintas, na primeira, ocorre um aumento no número de células T nos linfonodos, conhecida como fase de sensibilização (BLAUVELT; HWANG; UDEY, 2003; SAIN-MEZARD et al., 2004). Na segunda etapa, fase de indução, as quimiocinas são sintetizadas, após, células endoteliais e os mastócitos são ativados, e ocorre uma infiltração de polimorfonucleares (WATANABE et al., 2002). As células T interagem com células cutâneas apresentadoras de antígeno. Portanto, células citotóxicas T CD8 + ativadas produzem citocinas do tipo 1, tais como IFN- γ e quimiocinas que induzem a ativação

de células cutâneas. Elas também induzem a apoptose de queratinócitos e permitem o recrutamento de um infiltrado celular que é característico da hipersensibilidade cutânea (FEHR et al., 1994; CAVANI et al., 2001). Algumas doenças de pele como psoríase, vasculite cutânea e dermatite de contato podem ser associadas com o estresse oxidativo, durante a fase pré-imunológica, seguindo a exposição ao alérgeno de contato que prontamente se auto-oxida, e também durante as fases tardias de infiltração de células inflamatórias (SHARKEY et al., 1990; FUCHS; FREISLEBEN; PACKER, 1992; PICARDO et al., 1996).

Em nosso estudo foi possível observar que não houve dano na estrutura lipídica no fígado e nos rins (níveis de MDA baixos) quando as formulações com óleo livre (GC_{OB}), associação de óleo livre com fármaco livre (GC-DB_{OB}) e gel-creme com liofilizado das nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona, tratamento alternado (GCL-DB-NC_{OB} A) foram aplicadas (Figura 7). Isso se deve, provavelmente pelo óleo de borragem apresentar propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CONFORTI et al., 2008). A diferença observada entre o tratamento com a mesma formulação, porém com a diferente frequência de aplicação, pode ser explicada pela liberação controlada desse carreador (artigo 1), o que demonstra que durante o tratamento com dias alternados os ativos tiveram mais tempo para agir e exercerem seus efeitos benéficos. Jaques e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes, em que as formulações com propionato de clobetasol livre (diário) e nanoestruturado (diário e alternado) reduziram os danos oxidativos.

Além disso, neste trabalho observou-se um aumento significativo dos níveis de MDA (Figura 7) nos grupos DC, GCL-DB-NC_{OB}, GCL-NC_{OB} e GC quando comparados ao grupo Controle, de modo que no primeiro o aumento foi mais pronunciado. Isso gerou uma resposta protetora nos animais destes grupos, representada pelo aumento dos níveis de NPSH (Figura 8) e da atividade antioxidante da catalase (Figura 9). Em outro estudo, o aumento de MDA também foi evidenciado para o grupo dermatite e para o grupo tratado somente com as nanopartículas, mostrando que a dermatite de contato e os nanocarreadores aumentam o estresse, assim como as defesas antioxidantes, também, se alteram (JAQUES et al., 2012). Em nosso trabalho, os tratamentos com as nanocápsulas aumentaram o estresse, a menos que o corticóide esteja junto e que a aplicação seja em dias alternados (grupo GCL-DB-NC_{OB} A).

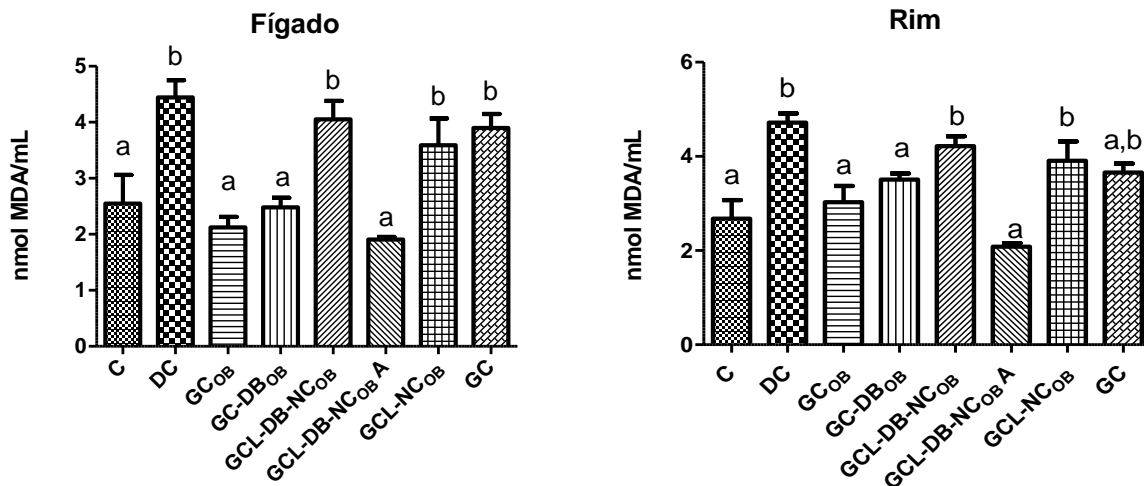


Figura 7 - Níveis de TBARS em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GC_{OB}, DC tratado com óleo livre; GC-DB_{OB}, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NC_{OB}, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-DB-NC_{OB} A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NC_{OB}, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média ± EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls (p<0,05) para letras diferentes.

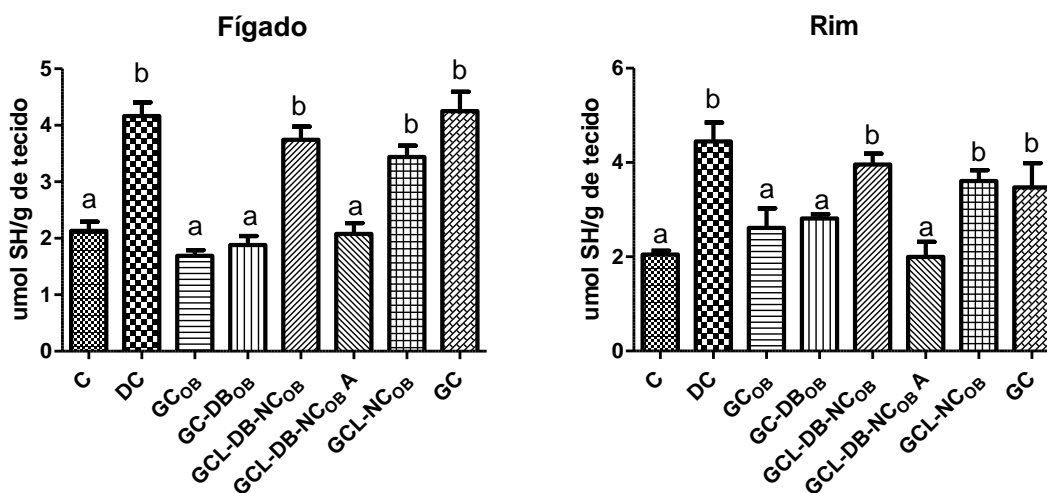


Figura 8 - Níveis de grupos sulfidrila não-proteicos em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GC_{OB}, DC tratado com óleo livre; GCL-DB_{OB}, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NC_{OB}, DC tratado com betametasona e óleo de borragem

nanoestruturado GCL-DB-NC_{OB} A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GC-NC_{OB}, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média \pm EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ($p < 0,05$) para letras diferentes.

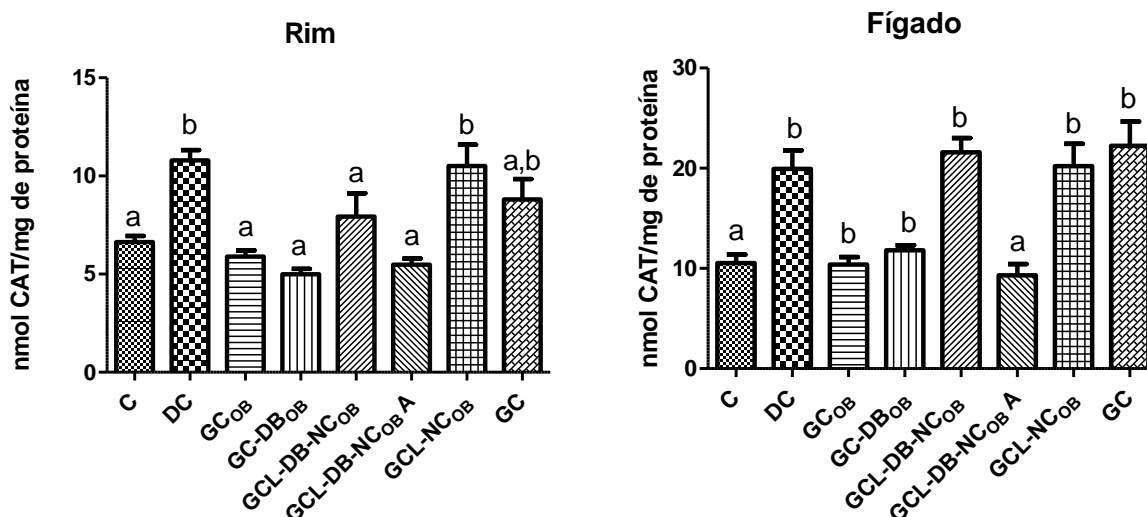


Figura 9 - Níveis de catalase em fígado e rim de ratas com dermatite de contato induzida por NiSO₄ e tratadas com betametasona livre e nanoestruturada. C, grupo controle; DC dermatite de contato; GC_{OB}, DC tratado com óleo livre; GC-DB_{OB}, DC tratado com óleo e fármaco livre; GCL-DB-NC_{OB}, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado GCL-DB-NC_{OB} A, DC tratado com betametasona e óleo de borragem nanoestruturado em dias alternados; GCL-NC_{OB}, DC tratado com óleo de borragem nanoestruturado; GC, DC tratado com gel-creme base. A barra representa a média \pm EPM para 5 animais do mesmo grupo. ANOVA teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ($p < 0,05$) para letras diferentes.

Estudos relacionados a toxicidade das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo PCL como polímero foram realizados. Bulcão e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos toxicológicos de tais nanopartículas em ratos *Wistar*, após administração intraperitoneal de doses únicas e doses repetidas, por 28 dias. A maior parte dos marcadores de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade permaneceram dentro dos valores de referência e/ou semelhantes a influência metodológica, indicando que as nanocápsulas podem ser um sistema seguro de administração de fármacos. Em outro estudo, verificou-se que as nanopartículas biodegradáveis de PCL não apresentaram toxicidade após 28 dias consecutivos de

administração intradérmica, sendo carreadores promissores para aplicação futura em vacinas e dispositivos baseados em *patches*, melhorando a entrega de fármacos (BULCÃO et al., 2014). Ainda, o estresse oxidativo e os níveis de marcadores inflamatórios em ratos foi investigado, após administração intradérmica e intraperitoneal subcrônica das nanocápsulas de PCL (BULCÃO et al., 2015). Os autores relataram que as nanocápsulas não induziram a peroxidação lipídica no plasma, fígado, rim e tecidos cardíacos, exceto para o cérebro após a administração intradérmica da dose mais elevada. Não houve alterações importantes na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em comparação com os controles. De um modo geral, os resultados via intraperitoneal não alteraram o estado oxidativo em doses repetidas, proporcionando a utilização segura das nanocápsulas de núcleo lipídico como sistema nanocarreador. No entanto, os resultados da via intradérmica, modificaram o estado oxidativo e inflamatório, o que pode ser uma consequência da reação inflamatória local, sendo assim, requer uma investigação mais aprofundada ou rotas alternativas de administração.

CONCLUSÃO

Os géis-creme preparados a partir dos produtos secos redispersíveis, obtidos por liofilização, contendo nanocápsulas de núcleo lipídico com o óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona apresentaram características adequadas para aplicação tópica, possuindo semelhante perfil de espalhabilidade e comportamento reológico de acordo com o modelo de Herschel-Bulkley. Em relação ao estudo *in vitro* de permeação/penetração cutânea, o dipropionato de betametasona foi distribuído através das diferentes camadas da pele, sendo que não foi detectado no meio receptor para as formulações com as nanoestruturas, evitando danos sistêmicos. No teste de eficácia *in vivo* de indução de dermatite de contato, a formulação em estudo foi capaz de causar dano tecidual comprovada pela avaliação histopatológica, com alterações nas atividades de enzimas do sistema purinérgico, as quais participam da modulação da resposta inflamatória, e dano oxidativo no fígado e rim dos animais. Além disso, a formulação GC-NC_{OBDB} A apresentou efeitos benéficos, sendo efetiva na preservação histológica da pele, diminuição da atividade das enzimas purinérgicas e redução do dano oxidativo, assim como, as formulações de óleo livre e/ou associado ao dipropionato de betametasona livre, porém estas ainda apresentaram características discretas de inflamação na avaliação da pele.

REFERÊNCIAS

ALBANESI, C. Keratinocytes in allergic skin diseases. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 5, p. 452–456, 2010.

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

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.

BETONNI, C. C. et al. Isotretinoin-loaded nanocapsules: Stability and cutaneous penetration by tape stripping in human and pig skin. **Journal of Biomedical and Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 258–271, 2012.

BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2565–2575, 2006.

BLACK, H. S. ROS: a step closer to elucidating their role in the etiology of light-induced skin disorders. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 13–15, 2004.

BLAUVELT, A.; HWANG, S. T.; UDEY, M. C. Allergic and immunologic diseases of the skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111 (2Suppl.), p. 560–570, 2003.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. (2003) Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, p. 663–669, 2003.

BROSCHE, 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.

BRUM, L. M. et al. Atividade da NTPDase de linfócitos na dermatite de contato antes e após tratamento com dexametasona nanoestruturada. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 876–884, 2009.

BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, p. 162–176, 2013.

BULCÃO, R. P. et al. Do poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules induce oxidative or inflammatory damage after in vivo subchronic treatment? **Toxicology Research**, v. 4, p. 994-1005, 2015.

BULCÃO, R. P. et al. *In vivo* toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 167–177, 2014.

CAVANI, A. et al. Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 118–120, 2001.

CAVANI, A.; DE PITÀ, O.; GIROLOMONI, G. New aspects of the molecular basis of contact allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 7, n. 5, p. 404–408, 2007.

CHAN, K.M.; DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, p. 375–380, 1986.

CONFORTI, F. et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 144–151, 2008.

CONTRI, R. V. et al. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 820–830, 2014.

CORSINI, E. et al. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 74–81, 2013.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007.

DEL ROSSO, J.; FRIEDLANDER, S. F. Corticosteroids: options in the area of steroid-sparing therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 50–58, 2005.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. **Drug Development Research**, v. 59, p. 171–174, 2003.

DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoreceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. **Immunology Today**, v. 16, p. 524–528, 1995.

DWYER, K. M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1, p. 171–180, 2007.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

FEHR, B. S. et al. Contact sensitization induces proliferation of heterogeneous populations of hapten-specific T cells. **Experimental Dermatology**, v. 3, n. 4, p.189–197, 1994.

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

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

FUCHS, J.; FREISLEBEN, H. J.; PACKER, L. Antioxidants in the skin. In: **Pharmacology of the Skin**, Ed. H. Mukhtar, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 250–267, 1992.

GARG, A. et al. Spreading of Semisolid Formulations. **Pharmaceutical Technology**, p. 84–105, 2002.

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.

GILLET, A. et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 223–231, 2011.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric Method. In: BERGMAYER, H. U. editor. **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie Weinheim, p. 315–323, 1984.

GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo - malondialdeído. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 275–279, 2008.

HENGGE, U. R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 1–15, 2006.

HITOGLU, S. et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 411–416, 2001.

HOSSAIN, M. A.; AHMED, S. U.; PLAKOGIANNIS, F. M. Effect of vehicle systems, pH and enhancers on the permeation of highly lipophilic aripiprazole from Carbopol 971P gel systems across human cadaver skin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, p. 323–30, 2012.

JAQUES, J. A. et al. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 410, p. 34–39, 2011.

JAQUES, J. A. S. et al. An experimental model of contact dermatitis: evaluation of the oxidative profile of wistar rats treated with free and nanoencapsulated clobetasol. **Redox Report**, v. 17, n. 5, p. 206–213, 2012.

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, 1996.

KAPLAN, D. H.; IGYÁRTÓ, B. Z.; GASPARI, A. A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 114–124, 2012.

KATO, Y. The gift of natural products. **Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan**, v. 68, p. 757–762, 2010.

KIM, D. et al. 2,4-dinitrofluorobenzene modifies cellular proteins and induces macrophage inflammatory protein-2 gene expression via reactive oxygen species production in RAW 264.7 cells. **Immunological Investigations**, v. 38, p. 132–152, 2009.

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

KÜNZLI, B. M. et al. Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibrosis in CD39-null mice. **Gastroenterology**, v. 134, p. 292–305, 2008.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-ATPase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9–15, 2005.

LIU, J. et al. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191–195, 2007.

MARCHIORI, M. L. et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010.

MEWIS, J.; WAGNER, N. J. Thixotropy. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 214–227, 2009.

MIZUASHI, M. et al. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 579–586, 2005.

MIZUMOTO, N. et al. CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 358–365, 2002.

NAGELREITER, C. et al. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fluticasone acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, p. 305–312, 2013.

NAKAI, K.; YONEDA, K.; KUBOTA, Y. Oxidative stress in allergic and irritant dermatitis: from basic research to clinical management. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 202–209, 2012.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 49, n. 2, p. 474–478, 1972.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

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.

PARISER, D. Topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis: focus on percutaneous absorption. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, p. 264–273, 2009.

PEREIRA, J. M. **Dermatoscopia**. São Paulo: Atheneu. p. 45–48, 2001.

PICARDO, M. et al. Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. **British Journal of Dermatology**, v. 134, p. 681–685, 1996.

POURCHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 e ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13, p. 1438–1443, 2009.

RIGO, L. A. et al. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 10, p. 1387–1391, 2012.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROCHA, N.; HORTA, M.; SELORES, M. Terapêutica Tópica em Dermatologia Pediátrica. **Nascer e Crescer–Revista do Hospital de Crianças Maria Pia**, v.13, n. 3, 2004.

SAHOO, S. K., PARVEEN, S. PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007.

SAINT-MEZARD, P. et al. Allergic contact dermatitis. **European Journal of Dermatology**, v.–14, n. 5, p. 284–295, 2004.

SANNA, V.; CARIA G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the *ex vivo* skin permeability of Econazole nitrate. **Powder Technology**, v. 201, p. 32-36, 2010.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 296–302, 2006.

SHAH, V. P. et al. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 82, p. 21–28, 1992.

SHARKEY, P. et al. A possible role for superoxide production in the pathogenesis of contact dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 71, p. 156–159, 1990.

SILVA, A. L. M. et al. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, p. e223–e230, 2013.

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.

SIQUEIRA, N. M. et al. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 3, p. 166–174, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VUORELA, P. et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1375–1389, 2004.

WATANABE, H. et al. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, n. 4, p. 407–412, 2002.

WEBER, J. et al. Association of borage oil and betamethasone dipropionate in lipid-core nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, p.1-9, 2015.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 453–466, 2008.

WOKOVICH, A. M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 1–8, 2006.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44–56, 2001.

ZÖLLER, N. N. et al. Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model, **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 747–759, 2008.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

Os corticosteróides tópicos vêm sendo usados para os tratamentos de doenças de pele, por apresentarem atividades vasoconstritoras, anti-inflamatória e efeitos antiproliferativos e imunossupressivos sendo efetivos no tratamento da psoríase e dermatite atópica (SENYIGIT et al., 2009). No entanto, podem provocar efeitos adversos como atrofia da pele, acne esteroide, hipopigmentação e dermatite de contato alérgica (HENGGE et al., 2006; ZÖLLER et al., 2008).

Para contornar esses efeitos, a nanotecnologia, possui grande relevância pelo fato de exercer um controle na liberação de fármacos de forma precisa, reprodutível e segura, proporcionando o direcionamento do mesmo no local de ação específico, bem como modificar suas propriedades (SCHAFFAZICK et al., 2003a; HUYNH et al., 2009; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

Aliado a isso, o uso de substâncias vegetais em sistemas nanoestruturados vem sendo investido por diversos motivos, dentre eles a vantagem do sinergismo terapêutico agregado ao núcleo oleoso, além da possibilidade dos óleos em influenciar nas propriedades dos nanocarreadores (FREITAS, 2006; ZULFAKAR et al., 2010; RIGO et al., 2011). Baseado nisso, esse trabalho buscou, a partir de trabalho prévio realizado por Weber e colaboradores (2015), o qual relata, pela primeira vez, a obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona, contornar alguns obstáculos verificados no que se refere, especialmente, à estabilidade das suspensões. Neste sentido, uma menor concentração de fármaco foi empregada (de 0,5 para 0,25 mg/mL). Além disso, as suspensões foram desidratadas por liofilização obtendo uma forma sólida mais estável em relação às suspensões líquidas originais. O produto seco obtido foi, por sua vez, incorporado em formulações semissólidas do tipo gel-creme para potencial aplicação em doenças inflamatórias de pele. Estas estratégias tecnológicas levaram em consideração alguns aspectos importantes, dentre eles a baixa estabilidade das nanopartículas poliméricas em meio aquoso, as quais são suscetíveis à hidrólise de seus componentes, degradação do polímero, migração do fármaco associado às nanoestruturas para o meio aquoso, contaminação microbiológica, entre outros (SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a). Neste sentido, técnicas de desidratação para a sua conversão em formas sólidas são descritas na literatura, como a liofilização (SAEZ et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003b).

Além disso, suspensões coloidais são, geralmente, incorporadas em formulações semissólidas como sendo um líquido de entumescimento do polímero formador de gel ou um constituinte aquoso de uma emulsão (MILÃO et al., 2003; ALVES et al., 2005; MARCHIORI et al., 2010). Porém, em alguns casos para o ajuste da concentração final de fármaco no semissólido é necessário à adição de um grande volume da suspensão aquosa, inviabilizando a adição de outros excipientes líquidos necessários à formulação dermatológica, como emolientes e umectantes, fundamentais para o tratamento de determinadas patologias, constituindo-se em um dos principais obstáculos para esse desenvolvimento. Então, a obtenção de sistemas pulverulentos a partir de suspensões coloidais, mostra-se como uma estratégia para contornar esses problemas.

A conversão das suspensões em pó para posterior utilização foi proposta por Terroso e colaboradores (2009), na preparação de hidrogéis contendo coenzima Q10 nanoencapsulada e por Marchiori (2010) que empregou a secagem por aspensão nas nanocápsulas de núcleo lipídico com tretinoína para posterior adição em hidrogéis.

A redução da concentração do dipropionato de betametasona proporcionou a obtenção de suspensões coloidais homogêneas, com coloração leitosa branca e com reflexo azulado (efeito *Tyndall*), característico dos sistemas coloidais (SANTOS MAGALHÃES et al., 2000; GUTERRES; POHLMANN; SCHAFFAZICK, 2007); tamanho nanométrico de partículas ($NC_{OB} = 198 \pm 10$ nm e $BD-NC_{OB} = 197 \pm 05$ nm), PDI abaixo 0,10 demonstrando a homogeneidade do sistema e pH levemente ácido ($NC_{OB} = 6,29 \pm 0,15$ e $BD-NC_{OB} = 6,35 \pm 0,18$). Os valores encontrados estão de acordo com aqueles normalmente verificados em outros trabalhos para nanocápsulas desenvolvidas pelo mesmo método de preparação (BERNARDI et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; FLORES et al., 2011; WEBER et al., 2015). Cabe salientar que não foram verificadas diferenças entre os valores de tamanho de partícula, potencial zeta e pH em comparação com as nanocápsulas sem o fármaco (contendo somente o óleo de borragem), diferindo dos resultados obtidos por Weber e colaboradores (2015). Esta semelhança entre as formulações pode estar relacionada a menor quantidade de dipropionato de betametasona utilizada.

Para a quantificação do fármaco nas suspensões e nos produtos secos foi utilizado método validado (WEBER et al., 2015) com algumas modificações, seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A especificidade foi comprovada pela ausência de picos pela análise das suspensões sem o fármaco (NC) e pela pureza do pico cromatográfico. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 5,0 a 40,0 µg/mL, preciso e exato de acordo com as condições analíticas

empregadas. O teor de betametasona quantificado nas nanocápsulas foi de $0,25 \pm 0,01$ mg/mL e nos pós de $1,78 \pm 0,02$ mg/g, valores estes próximos aos teóricos, indicando que não houve perda de fármaco durante a preparação das nanocápsulas e não houve degradação ou perda seletiva de fármaco durante o processo de desidratação das formulações. A eficiência de encapsulamento foi de, aproximadamente, 100%, semelhante ao resultado encontrado para as suspensões com o dobro da concentração de betametasona (WEBER et al., 2015), e satisfatório comparado aos lipossomas de dipropionato de betametasona desenvolvidos por Gillet e colaboradores (2011).

A estabilidade das suspensões foi realizada em temperatura ambiente por um período de 30 dias. As formulações não apresentaram alterações relevantes em relação ao tamanho médio de partículas, polidispersão e pH ($p > 0,05$). O potencial zeta apresentou maior variação, mas permaneceu na mesma faixa e não caracterizou aumento ou diminuição com o tempo. O teor de fármaco após 30 dias foi de 93%. Esses resultados demonstram que a redução da concentração de fármaco foi satisfatória no sentido de aumentar a estabilidade do fármaco e do sistema.

Outra análise realizada durante a estabilidade das nanocápsulas foi a verificação da presença de nanocristais. Para tal, amostras da suspensão coloidal foram mantidas em repouso e alíquotas da porção superior (sem agitação prévia) foram retiradas para a quantificação do fármaco (teor de $0,24 \pm 0,01$ mg/mL de betametasona). Para confirmar esse resultado, procedeu-se o teste de distribuição do fármaco pelo algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013), no qual se constatou-se que a maior quantidade de fármaco encontra-se concentrado no núcleo das nanocápsulas (tipo VI), corroborando com a ausência de nanocristais.

A viscosidade das suspensões foi determinada, sendo que tanto as formulações brancas como com fármaco apresentaram comportamento de fluxo Newtoniano, caracterizado por uma viscosidade constante em relação à velocidade de cisalhamento. Este comportamento reológico está de acordo com outros trabalhos descritos na literatura (HUSSEIN et al., 2009; SHAKEEL et al., 2009; MARCHIORI et al., 2012; KATZER et al. 2014).

Os pós obtidos por liofilização foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula, PdI, rendimento do processo, índice de ressuspensão, teor de fármaco e análise morfológica. Para alcançar os benefícios destes carreadores farmacêuticos, a escolha de um excipiente hidrossolúvel, como a trealose, se deve à facilidade de redispersão destes pós e, conseqüentemente, à reconstituição dos sistemas nanoestruturados (TEWA-TAGNE et al., 2007; KHO e HADINOTO, 2010). Os produtos secos após redispersão apresentaram-se com

tamanho de partícula na escala nanométrica, PDI adequado para os liofilizados com fármaco e um pouco acima do desejável para os brancos. Não houve mudança no diâmetro de partículas após ressuspensão em relação às suspensões originais, apresentando índices de ressuspensão próximos de 1,0. Esses resultados corroboram com estudos reportados na literatura em que as características das suspensões originais foram mantidas, a partir de produtos liofilizados redispersos em água (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006b; ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006c; NAKAGAWA et al., 2011; KHAYATA et al., 2012). O rendimento dos produtos desidratados foi semelhante com valores acima de 90 %, como esperado. Durante 60 dias, o teor de betametasona nos pós foi determinado, o qual permaneceu estável ($p > 0,05$) e semelhante ao inicial (1.78 ± 0.02 mg/g).

A análise morfológica dos pós demonstrou uma superfície rugosa com a presença de estruturas aproximadamente esféricas. Aparentemente, o tamanho de partículas foi próximo a 1000 nm, provavelmente por as nanoestruturas ficarem aderidas a matriz de trealose. Entretanto, quando o adjuvante está solúvel, como é o caso da trealose, ele seca juntamente com as nanoestruturas e formam os microaglomerados com organização estrutural aleatória (TEWA-TAGNE et al., 2007; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009). A recuperação dos sistemas nanoestruturados foi verificada, também, pela análise do perfil de distribuição das partículas por difração a laser, que após redispersão em água por 60 minutos, apresentaram um pico unimodal na faixa nanométrica. Pode-se verificar que o sistema é completamente redispersível e indicou uma boa homogeneidade, com valores de Span próximos a 1,0.

A liberação *in vitro* da betametasona foi realizada em sacos de diálise de acordo com as condições descritas no capítulo 1. Uma solução do fármaco livre foi empregada para comparação. Observou-se que a suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico e a ressuspensão dos pós liofilizados apresentaram perfis de liberação semelhantes. Sendo que, não apresentaram diferença significativa no percentual liberado após 24 h ($p > 0,05$), apesar das diferenças encontradas entre os tempos 4 e 12 h. Porém, quando as formulações nanoestruturadas foram comparadas a solução fármaco não associado, verificou-se que os nanossistemas tiveram maior capacidade de controlar a liberação da betametasona. Para uma melhor análise dos resultados, a modelagem matemática foi realizada. A liberação de primeira ordem (monoexponencial) foi observada para as três amostras, a qual indica que a liberação ocorre em um estágio único, e não há uma liberação rápida inicial ou efeito *burst*. O mecanismo de liberação pela Lei das Potências (Korsmeyer-Peppas) indicou que as nanocápsulas ($n=0,72$) e os pós redispersos ($n=0,84$) possuem um transporte anômalo, caracterizado pelo expoente de liberação entre $0,43 < n < 0,85$. Os resultados indicam que a

liberação do fármaco é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas, seguido da difusão do dipropionato de betametasona. Em relação aos resultados obtidos no estudo de liberação realizado por Weber e colaboradores (2015), empregando uma maior concentração de fármaco (0,5 mg/mL), no qual cerca de 80% do fármaco foi liberado em 12 horas, se verificou diferenças entre as amostras. Quando analisamos a modelagem matemática, ambos mostraram comportamento monoexponencial, mas com diferenças nos tempos de meia-vida, enquanto que a formulação com maior concentração apresentou $t_{1/2}$ vida= $6,83 \pm 0,72$ em nosso estudo estes valores praticamente triplicaram para $t_{1/2}$ vida= $18,13 \pm 1,17$. Assim, as formulações desenvolvidas mostraram melhor controle de liberação, o que indica que a concentração de fármaco pode interferir neste parâmetro. Provavelmente, devido ao fármaco não estar totalmente nanoencapsulado nas formulações com 0,50 mg/mL, podendo estar na forma de nanocristais, o que proporcionou maior taxa de liberação e também precipitação da suspensões.

Portanto, esses resultados demonstraram a viabilidade de obter produtos desidratados pelo método de desidratação proposto, a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem e dipropionato de betametasona. Após esta etapa, procedeu-se a incorporação dos pós em uma base semissólida do tipo gel-creme, destinada à aplicação tópica.

Assim, no capítulo 2 deste trabalho foram descritas as etapas que envolveram o desenvolvimento de géis-creme a partir do produto liofilizado das nanocápsulas de óleo de borragem associado ou não ao dipropionato de betametasona. Estes foram caracterizados e utilizados no teste de permeação/penetração cutânea e a avaliados em um modelo experimental de dermatite de contato.

Como inovação desse trabalho, usou-se o FocusGel 305, um agente espessante e emulsionante pré-neutralizado, o qual atua em diferentes níveis de pH (2 a 11), emulsiona fases oleosas proporcionando uma textura cremosa ou de gel-creme. Até o momento esta matéria-prima não foi empregada para incorporação de nanocarreadores. Os géis-creme apresentaram características organolépticas satisfatórias com coloração branca, aspecto homogêneo e odor característico. O pH das formulações apresentou valores em torno de 6,3, compatível com a aplicação tópica (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006), assim como nas dispersões coloidais. No que se refere ao tamanho de partícula os géis-creme apresentaram tamanho nanométrico (320 nm), porém com valores maiores que as suspensões originais, e valores de PDI (abaixo de 0,40). Este aumento dos valores de tamanho médio de partícula e na polidispersão, pode ser devido à presença dos componentes do FocusGel 305 e

dos demais presentes na formulação (trealose, tween 80 e imidazolidiniluréia), uma vez que o gel base apresentou tamanho de partícula de 367 ± 53 nm e PDI de $0,38 \pm 0,07$, dificultando a adequada dispersão da formulação em água, facilitando a agregação das nanopartículas (SANNA et al., 2010). Em relação ao teor de fármaco, o GCL-DB-NC_{OB} apresentou valor próximo à concentração teórica ($0,50 \pm 0,02$ mg/g), uma vez que empregou-se quantidade suficiente de pó liofilizado para se obter a concentração de 0,50 mg/g de betametasona, a qual é a mesma utilizada em formulações comerciais tópicas do fármaco.

Quanto a espalhabilidade, o GCL-DB-NC_{OB} e o GCL-NC_{OB} apresentaram perfis semelhantes, e não apresentaram diferença estatística significativa dos fatores de espalhabilidade ($p > 0,05$). A análise reológica foi, também, avaliada e todas as formulações apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano, característico de sistemas semissólidos. Além disso, todos os géis-creme apresentaram 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 velocidade de cisalhamento (KIM et al, 2003). Resultados semelhantes foram reportados na literatura com formulações semissólidas contendo nanoestruturas (FONTANA et al., 2011; OURIQUE et al., 2011; WEBER et al., 2015). Ambas as formulações não apresentaram tixotropia, que se caracteriza pela presença de um *loop* de histerese (área entre as curvas ascendente e descendente) calculada através do reograma de tensão *versus* velocidade de cisalhamento (MEWIS; WAGNER, 2009).

Considerando que os corticosteróides tópicos para serem terapêuticamente eficazes devem penetrar na pele e atingir a epiderme e a derme, locais de ação desses medicamentos (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; PARISER, 2009), avaliou-se a capacidade de permeação/penetração cutânea *in vitro* do dipropionato de betametasona a partir dos géis-creme contendo nanoestruturas e géis-creme com o fármaco não associado utilizando a pele de porco como membrana em células do tipo Franz. As formulações permearam pelas diferentes camadas da pele, no entanto, somente o GC-DB_{OB} foi quantificado no meio receptor, após 8 h de experimento. Ainda, as formulações apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à quantidade detectada na derme, sendo que o gel-creme contendo as nanoestruturas apresentou menor concentração nessa camada, o que pode indicar que níveis mais baixos de fármaco estão disponíveis para absorção sistêmica, uma vez que a derme é vascularizada.

A formulação com o fármaco e o óleo não associados apresentou maior permeação/penetração, sendo detectada no meio receptor, isso pode ser característico do

dipropionato de betametasona quando se encontra na forma livre, como já foi observado por Gillet e colaboradores (2011) que avaliaram a formulação comercial na forma farmacêutica do tipo loção (Diprosone®) e o fármaco foi quantificado no meio receptor; porém, quando incorporado em lipossomas, este somente foi detectado até a derme, corroborando com os resultados encontrados para o nosso nanocarreador. Outros trabalhos estão de acordo com os resultados obtidos, comprovando que as nanoestruturas possuem esse potencial em controlar a permeação de ativos na pele, retendo até a derme (LIU et al., 2007; ALVES et al., 2007; SILVA et al., 2013).

A última abordagem do trabalho foi avaliar a eficácia *in vivo* dos géis-creme utilizando o modelo experimental de dermatite de contato. Nesse estudo, avaliou-se a histologia nas orelhas das ratas, a atividade da E-NTPDase e da E-ADA e o estresse oxidativo. Para melhor comparação, além dos géis-creme com as nanoestruturas com e sem fármaco, foram preparadas formulações com os ativos não associados, um gel-creme base e um gel-creme GCL-DB-NC_{OB} A com tratamento em dias alternados, vaselina sólida para o grupo controle e NiSO₄ dissolvido em vaselina sólida para o grupo dermatite, totalizando 8 tratamentos.

Na avaliação histopatológica, o grupo controle não apresentou alterações patológicas teciduais, enquanto no grupo sensibilizado foi encontrado congestão vascular (eritema), presença de edema na derme, infiltrado inflamatório com presença de leucócitos na derme, espessamento da camada espinhosa e descamação do estrato córneo, o que comprovou a eficácia do protocolo de indução de dermatite proposto. Entre todos os tratamentos o mais eficaz foi o GC-DB-NC_{OB} A, pois não houve atrofia da camada espinhosa e alterações inflamatórias e houve pouco edema. Já, os animais tratados com gel-creme base não obtiveram melhora, apresentando congestão vascular com células inflamatórias, edema na derme, presença de leucócitos na derme e nos vasos e descamação da pele. Os demais grupos apresentaram uma leve melhora, mas ainda apresentaram algumas alterações inflamatórias.

Quanto a atividade da E-NTPDase, que serve como marcador de ativação linfocitária, os resultados mostraram um aumento na atividade da E-NTPDase para as ratas com dermatite de contato em comparação com o grupo controle, corroborando com os resultados encontrados na literatura com a utilização deste protocolo (BRUM et al., 2009; FONTANA et al., 2011). A maior atividade da E-NTPDase pode ser estimulada por um aumento na concentração do ATP extracelular, o que pode ocorrer durante o processo inflamatório. Nos grupos com dermatite de contato tratados com GCL-DB-NC_{OB} e GCL-DB-NC_{OB} A, pode-se observar que a associação do óleo de borragem e do dipropionato de betametasona nos

sistemas nanoestruturados, impediu o aumento da atividade da NTPDase e os níveis de ATP e ADP estavam reduzidos para o GCL-DB-NC_{OB} A e o GCL-DB-NC_{OB}. Os baixos níveis de sinalização purinérgica induzido pelo decréscimo das concentrações de nucleotídeos, modulam respostas inflamatórias e imunes pelos receptores P2 (DI VIRGILIO et al., 2003).

A ADA é uma enzima essencial para a proliferação e diferenciação dos linfócitos e monócito-macrófago no sistema imune, e alterações em sua atividade têm sido consideradas um indicador de distúrbios imunológicos (HITOGLU et al., 2001; POURSHARIFI et al., 2009). Pode-se observar que o grupo com dermatite de contato apresentou maior atividade da enzima. Já para os grupos tratados foi observado uma diminuição, mostrando-se semelhantes ao grupo controle. O grupo tratado com GCL-DB-NC_{OB} A apresentou uma diminuição significativa $p < 0,05$ em relação ao controle. Sendo assim, todos os tratamentos reverteram a atividade da enzima, ou previnem.

O estresse oxidativo e a atividade antioxidante foram avaliados no fígado e nos rins dos animais. Em nosso estudo foi possível observar que não houve dano na estrutura lipídica no fígado e nos rins (níveis de MDA baixos) quando as formulações com óleo livre (GC_{OB}), associação de óleo livre com fármaco livre (GC-DB_{OB}) e gel-creme com liofilizado das nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona, tratamento alternado (GCL-DB-NC_{OB} A) foram aplicadas. Isso se deve, provavelmente pelo óleo de borragem apresentar propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CONFORTI et al., 2008). A diferença observada entre o tratamento com a mesma formulação, porém com a diferente frequência de aplicação, pode ser explicada pela liberação controlada desse carreador (capítulo 1), o que demonstra que durante o tratamento com dias alternados os ativos tiveram mais tempo para agir e exercerem seus efeitos benéficos. Jaques e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes, em que as formulações com propionato de clobetasol livre (diário) e nanoestruturado (diário e alternado) reduziram os danos oxidativos. Além disso, neste trabalho observou-se um aumento significativo dos níveis de MDA nos grupos DC, GCL-DB-NC_{OB}, GCL-NC_{OB} e GC quando comparados ao grupo Controle, de modo que no primeiro o aumento foi mais pronunciado. Isso gerou uma resposta protetora nos animais destes grupos, representada pelo aumento dos níveis de NPSH e da atividade antioxidante da catalase. Em outro estudo, o aumento de MDA foi, também, evidenciado para o grupo dermatite e para o grupo tratado com somente nanopartículas, mostrando que a dermatite de contato e as nanopartículas aumentam o estresse, assim como as defesas antioxidantes, também, se alteram (JAQUES et al., 2012). Em nosso trabalho, os tratamentos com

nanocápsulas aumentaram o estresse, a menos que o corticóide esteja junto e que a aplicação seja em dias alternados (grupo GCL-DB-NC_{OB} A).

Por fim, o conjunto de resultados demonstrou a possibilidade de desenvolvimento de géis-creme a partir de produto nanoestruturado liofilizado contendo o dipropionato de betametasona e o óleo de borragem para o tratamento de dermatite de contato. A formulação com tratamento alternado (GCL-DB-NC_{OB} A) se mostrou a mais efetiva, podendo ser benéfica para pacientes que apresentam doenças inflamatórias de pele, reduzindo os efeitos desconfortáveis que as formulações convencionais contendo corticosteroides provocam e sendo promissora para a parcela da população que é acometida por essas doenças.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleo de borragem e a associação ao dipropionato de betametasona (0,25 mg/mL) apresentaram características físico-químicas adequadas (tamanho nanométrico de partícula, baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo) e maior estabilidade em comparação as suspensões contendo maior proporção de fármaco (0,5 mg/mL);
- A liofilização foi utilizada para a desidratação das suspensões coloidais aquosas. Os nanossistemas puderam ser facilmente reconstituídos através da redispersão aquosa dos pós e possuem maior estabilidade do que as suspensões;
- A liberação *in vitro* do fármaco, tanto a partir das dispersões coloidais como dos produtos desidratados redispersos apresentou melhor controle da liberação em relação a solução com o fármaco livre;
- As formas sólidas obtidas por liofilização foram utilizadas como produtos intermediários na preparação de géis-creme destinados a aplicação tópica. Estes apresentaram características satisfatórias quanto ao pH, espalhabilidade, propriedades reológicas e teor de fármaco;
- O estudo de permeação/penetração cutânea *in vitro* evidenciou que a partir dos géis-creme com nanocarreadores o fármaco atingiu a derme, e não foi detectado no meio receptor, evitando efeitos sistêmicos;
- O ensaio *in vivo* da dermatite de contato demonstrou que os géis-creme contendo óleo de borragem e dipropionato de betametasona nanoestruturados com tratamento alternado foram os que apresentaram melhor eficácia dermatológica e redução do dano oxidativo nos tecidos avaliados, comprovando a atividade anti-inflamatória do fármaco e do óleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, M. M. A. et al. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 151–157, 2012.
- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688–1713, 2006a.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87–94, 2006b.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87–94, 2006c.
- ALAM, S. et al. Accelerated stability testing of betamethasone dipropionate nanoemulsion. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 1–4, 2012.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 74–82, 2006d.
- ALMEIDA, J. S. 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, n. 2, p. 165–172, 2009.
- ALVAREZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, M. L. G. Lípidos em preparações farmacêuticas e cosméticas. **Grasas y aceites**, v. 51, p. 74–96, 2000.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.
- ALVES, P. M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900–904, 2005.

ANDREASSI, M. et al. Efficacy of α -linolenic acid in the treatment of patients with atopic dermatitis. **Journal 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.

AUVILLAIN, M. et al. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S.T.P. Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 738–744, 1989.

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

BARNES, K. C. An update on the genetics of atopic dermatitis: Scratching the surface in 2009. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 1, p. 16–29, 2010.

BARRE, D. E. Potential of Evening Primrose, Borage, Black Currant, and Fungal Oils in Human Health. **Annals 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.

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, R. C. R. et al. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, p.195–208, 2012.

BERNARDI, A. 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.

BHARDWAJ, S. P.; SURYANARAYANAN, R. Molecular mobility as an effective predictor of the physical stability of amorphous trehalose. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3209–3217, 2012.

BIEBER, T. Atopic dermatitis 2.0: from the clinical phenotype to the molecular taxonomy and stratified medicine. **Allergy**, v. 67, p. 1475–1482, 2012.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1483–1494, 2008.

BOGUNIEWICZ, M. Topical treatment of atopic dermatitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 24, p. 631–644, 2004.

BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 475–480, 2006.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156–165, 2012.

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. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União. Poder Executivo, 02 jun., 2003.

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.

BRUM, L. M. et al. Atividade da NTPDase de linfócitos na dermatite de contato antes e após tratamento com dexametasona nanoestruturada. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 876-884, 2009.

BUSINCO, L. et al. Breast milk from mothers of children with newly developed atopic eczema has low levels of long chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 91, n. 6, p. 1134–1139, 1993.

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.

CHACON, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 99–107, 1999.

CHOI, M. J. et al. Morphological characterization of encapsulated fish oil with b-cyclodextrin and polycaprolactone. **Food Research International**, v. 42, p. 989–997, 2009.

CHUNG, N. O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, p. 42–50, 2012.

COLE, C. et. al. Filaggrin-stratified transcriptomic analysis of pediatric skin identifies mechanistic pathways in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, p. 82–91, 2014.

CONFORTI, F. et al. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 144–151, 2008.

CORK, M. J. et al. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p. 1892–1908, 2009.

COSTA, A. D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos. Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 367–373, 2005.

DADPARVAR, M. et al. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 510–517, 2014.

DE CHASTEIGNER, S. et al. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 5, p. 242–246, 1995.

DENBY, K.S.; BECK, L.A. Update on systemic therapies for atopic dermatitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, p. 421–426, 2012.

DESAI, S.D.; BLANCHARD, J. Pluronic® F127-based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine. **Drug delivery**, v. 7. n. 4, p. 201–207, 2000.

DIPROSONE: creme, pomada, loção. Responsável técnico Lucia Lago Hammes. Rio de Janeiro: Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica LTDA, 2014. Bula de remédio.

DIPROSPAN: solução injetável. Responsável técnico Lucia Lago Hammes. Rio de Janeiro: Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica LTDA, 2006. Bula de remédio.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. **Drug Development Research**, v. 59, p. 171–174, 2003.

EICHENFIELD, L. F. et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 2, p. 338–351, 2014.

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. et al. Mechanism of nanocapsules of *Matricaria recutita* L. extract formation by the emulsion-diffusion process. **Superlattices and Microstructures**, v. 50, p. 340–349, 2011.

EYERICH, K.; NOVAK, N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. **Allergy**, v. 68, p. 974–982, 2013.

FELDMAN, S.R.; YENTZER, B. A. Topical clobetasol propionate in the treatment of psoriasis: a review of newer formulations, **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 10, p. 397–406, 2009.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

FLORES, F. C., et al. Hydrogels Containing Nanocapsules and Nanoemulsions of Tea Tree Oil Provide Antiedematogenic Effect. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–10, 2014.

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

FONTANA, M.C. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2009.

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

FREITAS, S. et al. 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, R.B. et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131–1136, 2008.

GALLI, E. et al. Analysis of polyunsaturated fatty acids in newborn sera: a screening tool for atopic disease? **British Journal of Dermatology**, v. 130, p. 752–756, 1994.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

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.

GILLET, A. et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 223–231, 2011.

GILMAM, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds.). Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

GUNSTONE, F. D. Gamma linolenic acid occurrence and physical and chemical properties. **Progress in Lipid Research**, v. 31, n. 2, p. 145–161, 1992.

GUPTA, P.; GARG, S. Recent advances in semisolid dosage forms for dermatological application. **Pharmaceutical Technology**, p. 144–162, 2002.

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.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205–209, 2009.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57–63, 1995.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. Cap. 17, p. 247–264. São Paulo: Atheneu, 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**. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HENGGE, U. R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 1–15, 2006.

HENZ, B. M. et al. 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.

HIRSJARVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly (lactic acid) nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 488–494, 2009.

HITOGLU, S. et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 411–416, 2001.

HORROBIN, D. F. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 367–372, 2000.

HORROBIN, D. F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 31, n. 2, p. 163–194, 1992.

HUSSEIN, O. A. et al. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 808–819, 2009.

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

ILLI, S. et. al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 925–931, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)**, 2005.

ISHIHARA, T. et al. Efficient Entrapment of Poorly Water-Soluble Pharmaceuticals in Hybrid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 7, p. 2357–2363, 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.

JAEGHERE, F. et al. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and *in vitro* cell uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 859–66, 1999.

JAGER, E. et al. 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.

JAIN, N. K.; ROY, I. Effect of trehalose on protein structure. **Protein Science**, v. 18, p. 24–36, 2009.

JAQUES, J. A. S. et al. An experimental model of contact dermatitis: Evaluation of the oxidative profile of Wistar rats treated with free and nanoencapsulated clobetasol. **Redox Report**, v. 17, n. 5, p. 206–213, 2012.

JOSHI, M. R., MISRA, A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation and stabilization. **AAPS PharmSciTech**, v. 2, n. 4, p. 25. 2001.

KAMIYA, S. et al. Physical characteristics of freeze-dried griseofulvin-lipids nanoparticles. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 181–184, 2006.

KATZER, T. R. et al. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, in vitro drug release and eye toxicity. **Journal of Microencapsulation**, 31:519–528, 2014.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 631–644, 2007.

KHAYATA, N. et al. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, p. 254–259, 2012.

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, p. 133–140, 2010.

KHO K.; HADINOTO K. Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates. **Powder Technology**, v. 198, p. 354–363. 2010.

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

KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239–252, 2002.

KUO, I. et. al. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 266–278, 2013.

LANDI, G. Oral administration of borago oil in atopic dermatitis. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 11, n. 4, p. 115–120, 1993.

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

LINDSKOV, R.; HOLMER, G. Polyunsaturated fatty acids in plasma, red blood cells and mononuclear cell phospholipids of patients with atopic dermatitis. **Allergy**, v. 47, p. 517–521, 1992.

LIN, M. et al. 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. et al. 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** – ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

LIU, J. et al. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191–195, 2007.

LUENGO J. et al. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 191–198, 2006.

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

MANKU, M. S. et al. Reduced levels of prostaglandin precursors in the blood of atopic patients: defective delta-6-desaturase function as a biochemical basis for atopy. **Prostaglandins Leukotrienes and Medicine**, v. 9, p. 615–628, 1982.

MANKU, M.S. et al. Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. **British Journal of Dermatology**. v. 110, n. 6, p. 643–648, 1984.

MARCHIORI, M. L. et al. Hydrogel containing desamethasone-loaded nanocápsulas for cutaneous administration: preparation, characterization and *in vitro* drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010.

MARCHIORI, M. C. L, et al. Spray-Dried Powders Containing Tretinoin-Loaded Engineered Lipid-Core Nanocapsules: Development and Photostability Study . **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 2059–2067, 2012.

McALEER, M. A.; IRVINE, A. D. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 280–291, 2013.

MENTER, A et al. Comparing clobetasol propionate 0.05% spray to calcipotriene 0.005% betamethasone dipropionate 0.064% ointment for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 8, p. 52–57, 2009.

MEWIS, J.; WAGNER, N. J. Thixotropy. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p.214–227, 2009.

MIHARA, K. et al. Vital role of the itchscratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. **British Journal of Dermatology**, v. 151, p. 335–345, 2004.

MILÃO, D.; KNORST, M. T.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: Development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325, 2003.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. 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.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 238–245, 2003.

MÜLLER, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343–347, 2000.

NAKAGAWA, K. et al. Dispersibility of freeze-dried poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 177–188, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quimica Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 252–262, 2003.

OCHAITA, L.; FERNANDÉZ, S. Actualización en 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: 14 jun. 2014.

- OLIWIECKI, S. et al. Levels of essential and other fatty acids in plasma and cell phospholipids from normal controls and patients with atopic eczema. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 71, p. 224–228, 1991.
- ONG, P.Y. et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections In atopic dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, 2002.
- 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.
- 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.
- PARISER, D. Topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis: focus on percutaneous absorption. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, p. 264–273, 2009.
- PERUGINI, P. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 37–45, 2002.
- POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanosphers: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305–312, 2002.
- POURCHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 e ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13, p. 1438–1443, 2009.
- PROKSCH, E.; FÖLSTER-HOLST, R.; JENSEN, J. M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. **Journal of Dermatological Science**, v. 43, p. 159–169, 2006.
- PUGLIA, C. et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, p. 295–304, 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, p. 107–119. 1998.

RÉ, M-I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, p. 433–446, 2006.

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.

ROCHA, N.; HORTA, M.; SELORES, M. Terapêutica Tópica em Dermatologia Pediátrica. **Nascer e Crescer–Revista do Hospital de Crianças Maria Pia**, v. 13, n. 3, 2004.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379–387, 2000.

SANNA, V.; CARIA G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the *ex vivo* skin permeability of Econazole nitrate. **Powder Technology**, v. 201, p. 32–36, 2010.

SANDILANDS, A. et al. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 1285–1294, 2009.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and *in vitro* evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. 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**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-443, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração e fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R. 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, S. R. et al. Development of nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHIAVO, J. W. **Emprego do óleo de *Borago officinalis* L. no desenvolvimento de formulações semissólidas e nanocápsulas poliméricas destinadas ao tratamento tópico de doenças inflamatórias da pele**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SCHOEPE, S. et al. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy, **Experimental Dermatology**, n. 15, p. 406-420, 2006.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.19, p. 296-302, 2006.

SENYIGIT, T. et al. Different approaches for improving skin accumulation of topical corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 380, p. 155-160, 2009.

SHABDE, V. S.; HOO, K. A. Design and Operation of a Spray Dryer for the Manufacture of Hollow Microparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8329-8337, 2006.

SHAH, P. et al. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1607-1617, 2012.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W.; AHMED, M. A. Investigation of true nanoemulsion for transdermal potential of indomethacin: Characterization, rheological characteristics, and *ex vivo* skin permeation studies. **Journal of Drug Targeting**, v. 17, p. 435–441, 2009.

SHIMASAKI, H. PUFA content and effect of dietary intake of gamma-linolenic acid-rich oil on profiles of n-6, n-3 metabolites in plasma of children with atopic eczema. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 183–192, 1995.

SHOU, M. et al. 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.

SILVA, A. L. M. et al. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, p. e223–e230, 2013.

SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. **Journal of Food Lipids**, v. 15, p. 137–149, 2008.

STRANNEGÄRD, I. L.; SVENNERHOLM, L.; STRANNEGÄRD, O. Essential fatty acids in serum lecithin of children with atopic dermatitis and in umbilical cord serum of infants with high or low IgE levels. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 82, n. 3-4, p. 422–423, 1987.

SWARNAKAR, N. K. et al. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q-10 loaded polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6860–6874, 2011.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 26, p. 819–826, 2009.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 63–74, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 124–135, 2007.

THE MERCK MANUAL Online Medical Library for Healthcare Professionals. **Atopic dermatitis**. Whitehouse Station, NJ, EUA , 2013a. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/professional/dermatologic_disorders/dermatitis/atopic_dermatitis.html?qt=atopic%20dermatitis&alt=sh>. Acesso em: 13 jun. 2014.

THE MERCK MANUAL Online Medical Library for Healthcare Professionals. **Principles of topical dermatologic therapy**. Whitehouse Station, NJ, EUA , 2013b. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/professional/dermatologic_disorders/principles_of_topical_dermatologic_therapy/principles_of_topical_dermatologic_therapy.html?qt=corticosteroids&alt=sh>. Acesso em: 14 jun. 2014.

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

VICENT, M. et al. Comparison of freeze drying and spray drying to obtain porous nanostructured granules from nanosized suspensions. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p. 1019–1028, 2012.

WEBER, J. et al.. (2015). Association of Borage Oil and Betamethasone Dipropionate in Lipid-Core Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 1–9, 2015.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 453–466, 2008.

WILLIAMS, H.; FLOHR, C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 209–213, 2006.

WOLLENBERG, A.; FEICHTNER, K. Atopic dermatitis and skin allergies – update and outlook. **Allergy**, v. 68, p. 1509–1519, 2013.

WRIGHT, S.; BOLTON, C. Breast milk fatty acids in mothers of children with atopic eczema. **British Journal of Nutrition**, v. 62, n. 3, p. 693–697, 1989.

WRIGHT, S. Essential fatty acids and the skin. **Brazilian Journal Dermatology**, v. 125, n. 6, p. 503–515, 1991.

WRIGHT, S.; SANDERS, T.A. Adipose tissue essential fatty acid composition in patients with atopic eczema. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, n. 10, p. 501–505, 1991.

YADAV, K. S.; SAWANT, K. K. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1456–1465, 2010.

YANG, S. et al. Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19763–19773, 2013.

YANG, H.J.; JEON, Y.H.; PYUN, B.Y. Evaluation of patient's subjective severity using various scoring system in Korean children with atopic dermatitis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 28, p. 130–135, 2010.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.83, p. 156–167, 2013.

ZÖLLER, N. N. et al. Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model, **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 747–759, 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.