

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões
de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea
in vitro

Marta Palma Alves

PORTO ALEGRE, 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea
in vitro

Tese apresentada por **Marta Palma Alves** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Sílvia Stanisquaski Guterres

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.9.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Elfrides Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cardoso

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Solange Binotto Fagan

Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

A474f Alves, Marta Palma

Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. – Porto Alegre: UFRGS, 2006. - xiv, 166 p.: il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nimesulida. 2. Nanocápsulas. 3. Nanoesferas. 4. Nanoemulsões. 5. Penetração cutânea. 6. Formulações tópicas. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.451.3

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira - CRB10/480

AGRADECIMENTOS

Agradeço as professoras Dra. Sílvia e Dra. Adriana pela confiança, orientação, sensibilidade e amizade.

À minha família pela compreensão e apoio incondicional especialmente aos meus filhos Marcos e Juliana, minha mãe e ao Sico meu companheiro, meu porto seguro e amigo de todas as horas.

Aos meus colegas e amigos que não pouparam esforços para que este trabalho fosse realizado em especial a Tânia, Ana Laura, Cleber, Rui, Marcos, Helmoz, Julieta, Oscar, Juliana, Luciane e Jane.

Às minhas amigas Marta B., Gisele, Clarice, Simone e Maria Izabel pelo apoio nas horas incertas, quando o caminho a ser percorrido parecia longo demais.

À Clair pela dedicação, amizade, carinho e alegria com que cuidou dos meus bens mais preciosos.

Ao Dr. Nelson Liechavicius e a Laura, pela colaboração, atenção e incentivo.

Aos colegas da Farmácia Escola pela disponibilidade e apoio durante a minha ausência.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo profissionalismo e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Maria, à Rede Naobiotec/CNPq e ao Centro Universitário Franciscano pelo apoio na realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

Introdução;

Objetivos;

Capítulo 1: Introdução e artigos a serem submetidos ou publicados em periódicos científicos, referentes ao desenvolvimento e caracterização das nanopartículas incorporadas em formas semi-sólidas.

Capítulos 2: Introdução e artigos a serem submetidos a periódicos científicos, referentes à avaliação da permeação cutânea *in vitro*.

Discussão geral;

Conclusões;

Referências Bibliográficas.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	07
CAPÍTULO 1: Formulações semi-sólidas tópicas contendo nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas de nimesulida: desenvolvimento e caracterização reológica.....	11
<i>1.1. INTRODUÇÃO</i>	13
<i>1.2. PUBLICAÇÃO 1:</i> Propriedades reológicas no desenvolvimento de formulações semi-sólidas farmacêuticas e cosméticas: Fundamentação teórica e exemplos práticos.....	19
<i>1.3. PUBLICAÇÃO 2:</i> Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization	61
CAPÍTULO 2: Estudos de absorção percutânea em formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas de nimesulida.....	69
<i>2.1. INTRODUÇÃO</i>	71
<i>2.2. PUBLICAÇÃO 3:</i> Nanopartículas, nanocápsulas e nanoemulsões para aplicação tópica de produtos farmacêuticos e cosméticos.....	75
<i>2.3. PUBLICAÇÃO 4:</i> Penetration of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers	97
DISCUSSÃO GERAL	127
CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
BIOGRAFIA	157
PARECERES	161

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações tópicas semi-sólidas, utilizando como substância ativa a nimesulida, associando-a a sistemas coloidais (nanoesferas, nanocápsulas ou nanoemulsões). Os parâmetros de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea do antiinflamatório veículado aos sistemas nanoestruturados foram estudados através de metodologia “in vitro”, empregando pele humana como membrana. Os métodos de nanoprecipitação e nanodispersão foram utilizados e possibilitaram a obtenção de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida. A análise das características físico-químicas dos sistemas estudados demonstrou que os diâmetros médios obtidos foram em torno de 300 nm. As taxas de associação situaram-se próximas a 99 % e os valores de pH entre 5,1-5,3. As suspensões contendo nimesulida foram incorporadas em géis de Carbopol 940®, apresentando leve coloração amarelada e características organolépticas satisfatórias, após a incorporação das mesmas. As taxas de recuperação e os valores de pH para os géis contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão de nimesulida, mantiveram-se estáveis durante o período de armazenagem (120 dias). Todas as formulações de géis foram caracterizadas como sistemas não-newtonianos apresentando comportamento pseudoplástico (*shear thinning*), sendo os reogramas ajustados pelo modelo de Ostwald (coeficiente de regressão >0,99). Experimentalmente, nenhum fenômeno de tixotropia foi detectado para as formulações testadas e a incorporação dos nanocarreadores não modificou o tipo de fluxo apresentado por estes sistemas. Os diferentes sistemas nanocarreadores incorporados nos géis hidrofílicos, foram investigados em função do potencial de liberação do fármaco na pele, usando célula de difusão tipo Franz e técnica de *tape stripping* em pele humana. O fármaco foi detectado no estrato córneo para o gel contendo nanocápsulas (GNM-NC) e para o gel contendo nanoesferas (GNM-NS) de nimesulida, não havendo diferença significativa entre estes dois valores. Por outro lado, o fármaco não foi detectado no estrato córneo para o gel contendo nanoemulsão de nimesulida, sendo permeado diretamente para a derme. A presença da nimesulida na epiderme/derme foi significativamente maior para o gel contendo nanocápsulas (GNM-NC) do que para o gel contendo nanoesferas

(GNM-NS) ou nanoemulsão (GNM-NE). Os géis contendo nimesulida incorporada em nanocarreadores (GNM-NC, GNM-NS e GNM-NE) foram capazes de promover a penetração do fármaco no estrato córneo e/ou na camada de pele viável, com relação ao fármaco livre na mesma concentração. Estes estudos comparativos demonstraram a influência da presença do polímero e do tipo de nanocarreador na penetração do fármaco em pele humana.

Palavras-chave: Nimesulida, nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões, formulações tópicas, penetração cutânea.

ABSTRACT

Semi-solids dosage forms containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development, characterization and in vitro percutaneous permeation evaluation

The objective of this work was to develop and characterize semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanospheres, nanocapsules or nanoemulsion. In order to study the in vitro percutaneous penetration of nimesulide from semi-solid topical formulations containing nanocarriers, an in vitro methodology using human skin was employed. The nanoprecipitation and the spontaneous emulsification methods were used to prepare the colloidal suspensions and nanoemulsion. For all formulation the diameters are in the sub 300 nm ranges. The encapsulation efficiencies were close to 99 % in all cases and pH values ranged between 5.1 and 5.3. Each drug-loaded nanocarrier formulation was incorporated in Carbopol 940[®] gels. The semisolid dosage forms showed yellowish, glossy and homogeneous aspect after the incorporation of the colloidal suspensions and nanoemulsion. The recovery of nimesulide and the pH values for the gels containing nanoemulsion, nanospheres or nanocapsules remained constant during storage (120 days). For all formulations, the rheograms exhibited a non-Newtonian behavior presenting pseudoplastic characteristics and shear thinning. The rheograms were adjusted to Ostwald's model showing regression coefficients higher than 0.9900. None thixotropic phenomenon was experimentally detected under the test conditions for all formulations. The ability of delivering the drug into the human skin was investigated using stripping technique and Franz-type diffusion cells. The gel containing nanocapsules (GNM-NC) and the gel containing nanospheres (GNM-NS) released the nimesulide in the same extension into the stratum corneum (SC). On the other hand, for the gel containing nanoemulsion (GNM-NE), the nimesulide was not quantified in SC, but it has been directly permeated for the dermis. The penetration of the nimesulide using the gel containing nanocapsules (GNM-NC) was larger in the deeper skin than using the gel containing nanospheres (GNM-NS) or the one containing

nanoemulsion (GNM-NE). The gels containing nanocarriers (GNM-NC, GNM-NS and GNM-NE) were able to release the drug in the viable layer of the skin, comparing to a non-particulated nimesulide-loaded formulation at the same concentration. For the first time, this comparative study showed the influence of the presence of the polymer and of the type of nanocarrier on the permeation of a drug through the human skin.

Key Words: nimesulide, nanocapsules, nanospheres, nanoemulsion, topical formulation, skin penetration.

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos antiinflamatórios não-esteróides (AINES) são indicados nas situações que requeiram atividade antiinflamatória ou analgésica, tais como osteoartrite, distúrbios pós-traumáticos ou músculo-esqueléticos agudos, incluindo tendinite, tenossinovite, periartrite, luxação, entorse e lombalgia (Babar *et al.*, 1990; Curdy *et al.*, 2001).

Contudo, estes fármacos também podem provocar uma toxicidade gastrointestinal em alguns pacientes, o que pode resultar em danos à mucosa, irritação e hemorragia (Tunçay *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2001; Joseph *et al.*, 2002). Por exemplo, úlceras pépticas foram relatadas em 9 % dos pacientes com artrite crônica, quando tratados, por via oral, com 20 mg diárias de piroxicam (Babar *et al.*, 1990).

Preparações tópicas permitem a administração destes fármacos em pacientes que não podem tolerá-los por via oral. Existe um grande interesse no desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas contendo AINES, para evitar os efeitos de toxicidade gastrointestinal por via oral ou promover níveis significativos de fármaco no sítio de aplicação por períodos prolongados (Gürol *et al.*, 1995).

Vários autores propuseram-se a investigar a ação de alguns fármacos desta classe terapêutica em nível tópico (Tsai *et al.*, 1985; Babar *et al.*, 1990; Pandey *et al.*, 1992; Reddy e Udupa, 1993; Huang *et al.*, 1995; Doliwa, *et al.*, 2001; Curdy *et al.*, 2001). Especificamente, estudos também têm sido realizados com a nimesulida, um fármaco antiinflamatório não-esteróide, usado normalmente por via oral e retal em desordens inflamatórias e estado de dor associado à osteoartrite, câncer, tromboflebites, cirurgia oral e outros (Davis e Brogden, 1994). Alguns estudos demonstraram que o gel com nimesulida, apresentou uma melhor atividade antiinflamatória do que os géis com diclofenaco e piroxicam (Gupta *et al.*, 1996; Sengupta *et al.*, 1998; Dhaon *et al.*, 2000).

Os AINES, amplamente utilizados em reumatologia e condições inflamatórias, apresentam-se como uma classe de fármacos potencialmente adequada de ser incluída no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração tópica. Esta perspectiva oferece um desafio especial em desenvolver uma formulação adequada que possibilite a penetração do fármaco através da barreira constituída pelo estrato

córneo, permeação através das mais profundas camadas da pele e que garanta a atividade e efetividade terapêutica (Milão, 2003).

Atualmente existe um grande interesse na liberação seletiva de fármacos, em vista disso, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e eficiência das formulações. Os sistemas de liberação controlada/sustentada são uma resposta a esta tendência, uma vez que são planejados para proporcionar níveis ideais, ou próximos deles, por períodos prolongados, favorecendo o tratamento (Monaco, 2000). Neste sentido, polímeros biodegradáveis na forma de partículas coloidais, têm sido estudados com promissoras possibilidades de sucesso, para aplicações futuras em quimioterapia antimicrobiana, anticancerígena e antiinflamatória injetável, tópica e oftálmica (Couvreur, 1995; Yokoama e Okano, 1996; Giunchedi *et al.*, 1999; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000; Tunçai *et al.*, 2000; Kim e Lee, 2001).

Nanopartículas são sistemas nanoestruturados, medindo em torno de 10 nm a 1000 nm e tamanho similar aos lipossomas (vesículas fosfolipídicas). As nanopartículas podem consistir de uma matriz polimérica (nanoesferas) ou de um sistema reservatório oleoso envolvido por uma parede polimérica (nanocápsulas) (Barratt, 2000). Podem, também, serem constituídas, por um sistema emulsionado, consistindo de uma fase dispersa (óleo) em uma fase contínua (água) estabilizada por emulsionantes (nanoemulsão) (Kan *et al.*, 1999).

O estrato córneo é a camada mais externa da pele e oferece a principal resistência para a penetração de compostos aplicados topicamente. Consequentemente, o número de fármacos utilizados para a liberação transdérmica é bastante limitado. Várias substâncias químicas têm sido estudadas e empregadas com propósito de aumentar a permeação percutânea, como exemplo: o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida, os agentes tensoativos, os dissolventes (propilenoglicóis, álcoois, etc.), os ácidos graxos, entre outros (Turunen *et al.*, 1992; Asbill *et al.*, 2000; Santoyo *et al.*, 2000). Entretanto, paralelamente à função de aumentar a penetração cutânea dos fármacos, existe o inconveniente da irritação que estas substâncias causam à pele (Bentley, 1994).

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia mais promissora para aumentar a penetração de fármacos através da pele. Segundo Jenning e colaboradores (2000) as nanopartículas lipídicas sólidas, apresentam características vantajosas para a aplicação tópica, dentre elas destaca-se, o pequeno tamanho e distribuição estreita das partículas, o qual assegura um contato íntimo com o estrato córneo, aumentando conseqüentemente a quantidade de agente encapsulado capaz de penetrar na pele viável.

Investigações evidenciaram que tanto nanopartículas como lipossomas apresentam a tendência de acumularem-se em tecidos inflamados, podendo desta forma, abrirem-se novas perspectivas para atuação de fármacos antiinflamatórios ou antibióticos em áreas inflamadas. Esta especificidade, demonstrada por estes sistemas, pode representar novas possibilidades de terapia para várias doenças reumáticas (Kreuter, 1994).

Com base nas pesquisas relatadas na literatura que indicam a eficácia e a adequabilidade da via cutânea como alternativa terapêutica para administração de fármacos antiinflamatórios (Pandey *et al.*, 1992; Bernareggi, 1998; Foldvari, 2000), a presente pesquisa é centrada no estudo de formulações tópicas contendo nimesulida. A estratégia do trabalho foi baseada na incorporação de sistemas nanoparticulados contendo este fármaco em formulações tópicas semi-sólidas hidrofílicas. Cabe ressaltar, ainda, que não foram encontrados registros deste fármaco associado a sistemas nanoparticulados poliméricos em formulações plásticas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver e caracterizar formulações tópicas semi-sólidas, utilizando como substância ativa a nimesulida, associando-a a sistemas coloidais (nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões).

2.2. ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões poliméricas de nanocápsulas e nanoesferas contendo nimesulida, através do método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados.
- Preparar nanoemulsões contendo nimesulida, através do método de nanodispersão.
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos das suspensões coloidais de nimesulida (nanocápsulas, nanoesferas) e nanoemulsões.
- Preparar e caracterizar formulações de hidrogéis, contendo suspensões (nanocápsulas, nanoesferas) e nanoemulsões de nimesulida.
- Determinar o comportamento reológico (índice de plasticidade, consistência e espalhabilidade) das preparações tópicas, após a incorporação dos sistemas nanoestruturados.

- Utilizar metodologia “in vitro” para a avaliação dos parâmetros de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea do antiinflamatório veículado aos sistemas nanoestruturados.

***CAPÍTULO 1 - Formulações semi-sólidas tópicas contendo nanocápsulas,
nanoemulsões e nanoesferas de nimesulida: desenvolvimento e caracterização
reológica***

INTRODUÇÃO

O objetivo do presente capítulo foi desenvolver e caracterizar formulações tópicas semi-sólidas, utilizando como substância ativa a nimesulida, associando-a a sistemas coloidais (nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões).

A nimesulida, quimicamente a N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida, é um antiinflamatório não esteróide, utilizado como antipirético e analgésico. Difere da maioria dos compostos desta classe pelo fato de apresentar um radical sulfonanilida em lugar de um radical carboxílico. A nimesulida é um fármaco sintético, pouco solúvel em água (0,01 mg/mL) e apresentando um pKa de 6,46 (Piel *et al.*, 1997; Fallavena e Schapoval, 1997). A estabilidade térmica e fotoquímica deste fármaco foi avaliada, tendo sido verificado, pela utilização de métodos termogravimétricos, que a substância é muito estável e somente se decompõe a partir de 208 °C sem gerar subprodutos intermediários (Fallavena, 1998).

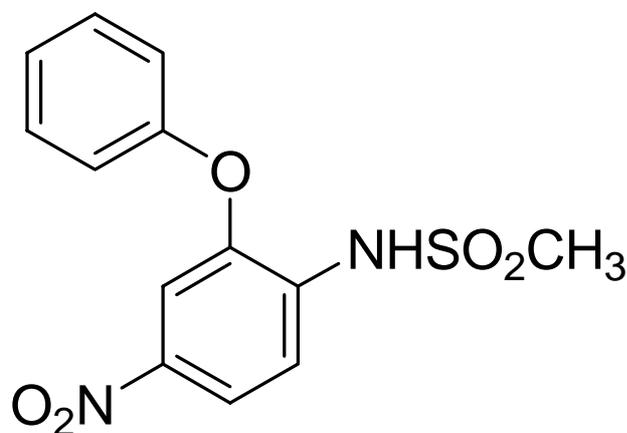


Figura 1. Nimesulida.

A nimesulida é extensamente usada para o tratamento de condições inflamatórias associadas com artrites reumáticas, infecções de área respiratória e inflamações de cavidade oral (Rabasseda 1997; Piel *et al.*, 1997). Como os demais AINES, seu efeito terapêutico é o resultado da habilidade para inibir a síntese de

prostaglandinas por inibição seletiva da ciclooxigenase-2. Este mecanismo de ação também influi sobre a agregação plaquetária, causando inibição da mesma.

A nimesulida pode, também, exercer outras propriedades farmacológicas, tais como (Piel *et al.*, 1997): inibição da fosfodiesterase tipo IV, geração reduzida do ânion superoxidase, prevenção da inativação da α 1-proteinase, inibição das proteinases (elastase e colagenase) e inibição da atividade e liberação da histamina.

É um fármaco utilizado mundialmente, sendo os países europeus os pioneiros a aprovarem sua utilização como antiinflamatório. Também no Brasil sua utilização é permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Apesar da menor incidência de reações adversas da nimesulida em relação aos outros antiinflamatórios não esteróides, algumas reações são relatadas na literatura, dentre as quais destacam-se (Rabassedá, 1997):

- Efeitos no trato gastrointestinal: cerca de 8,5 % dos pacientes que receberam 100 a 400 mg/dia de nimesulida apresentaram sintomas leves a moderados no trato gastrointestinal, tais como dispepsia, náuseas, dor abdominal, diarreia e vômitos.
- Efeitos dermatológicos: a ocorrência de “rash” cutâneo e prurido foram relatados em 0,1 % dos pacientes tratados com nimesulida.
- Efeitos hepáticos: em um estudo envolvendo novecentos e sessenta e três pacientes, 3,6 % apresentaram aumentos nos valores de fosfatase alcalina e 0,2 % apresentaram elevação significativa nas taxas de transaminases, rapidamente normalizados com a interrupção do tratamento. A nimesulida apresenta uma toxicidade hepática mais baixa que o piroxicam e o naproxeno.
- Efeitos do sistema nervoso: ocorrem em 7,1 % dos pacientes que recebem dose única de nimesulida; 0,1 % desses pacientes apresentam cefaléia, sonolência e vertigens. Esses sintomas ocorrem também em 0,1 % dos pacientes que recebem tratamento em doses múltiplas de nimesulida.
- Efeitos hematológicos: existem relatos de ocorrência de eosinofilia, anemia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia em alguns pacientes em tratamento com nimesulida.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de aumentar as propriedades de dissolução e a biodisponibilidade da nimesulida. Dentre os estudos, pode-se citar a utilização de sistemas quaternários (Meriani *et al.*, 2003) e o uso de agentes solubilizantes como PEG 400, propilenoglicol, lauril sulfato de sódio e Tween 80® (Castelli *et al.*, 2003). Também foram estudadas formulações, incluindo o fármaco em ciclodextrinas (Nalluri *et al.*, 2003), em membranas fosfolipídicas (Ferreira *et al.*, 2003) e em nanopartículas lipídicas sólidas (Patravale *et al.*, 2003).

Existe um produto comercial (Sulidin gel®), usando estrutura lamelar como sistema de liberação, promovendo a liberação percutânea da nimesulida e reduzindo a coloração amarela do gel na pele (Embil, Patente PCT/IB 9901460). Também foi encontrado registro de uma emulsão contendo cristais líquidos na interface O/A, exercendo dupla finalidade, ou seja, estabilizando o sistema emulsionante e controlando a liberação da substância ativa. Segundo os autores, a formação de um sistema reticular, ao longo do qual a substância ativa encontra-se homogeneamente dispersa, traz vantagens inquestionáveis, quando comparadas com formulações convencionais, emulsões O/A ou A/O, no que diz respeito à estabilidade da formulação e à liberação do fármaco (Bader *et al.*, Patente 6,288,121).

Nos últimos anos, sistemas utilizando micro ou nanopartículas para liberação de fármacos, estão sendo desenvolvidos como uma das estratégias mais promissoras para alcançar o local específico de atuação.

Fármaco vetorizado é definido como uma substância que tem uma liberação seletiva para sítios fisiológicos específicos, órgãos, tecidos ou células, onde a atividade farmacológica é requerida. Um aumento na concentração do fármaco em sítios específicos e/ou redução da toxicidade em sítios não específicos, pode levar a índices terapêuticos mais adequados (Yokoyama, 1996). Estes sistemas têm sido extensivamente estudados para administração oral e parenteral, podendo também serem utilizados para liberação de vários fármacos através da pele (Jalón *et al.*, 2001).

Entre os métodos utilizados para preparação de nanopartículas, pode-se citar a polimerização de monômeros dispersos e a dispersão de polímeros pré-formados (Lamprecht *et al.*, 1999; Tunçay *et al.*, 2000; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). O método da dispersão de polímeros pré-formados, seguida pela evaporação do solvente

(nanoprecipitação) foi proposto por Fessi e colaboradores (1988), evitando a presença de monômeros residuais na formulação obtida.

Segundo Tunçay (2000) a liberação do fármaco incorporado a nanopartículas depende de vários fatores, dentre eles: composição e peso molecular do polímero, substância incorporada, tamanho de partícula e porosidade. Desta forma, a escolha dos componentes do sistema é extremamente importante e tem sido aplicada com sucesso a vários materiais poliméricos tais como, poli(ácido lático), (PLA); poli(ácido lático-co-ácido glicólico), (PLGA); poli(ϵ -caprolactona), (PCL); etilcelulose, poli(cianoacrilatos de alquila) e poli(estireno) (Guterres *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 1996).

Considera-se ainda que a adequada caracterização das nanopartículas é pré-requisito para o controle de qualidade do produto, sendo um sério desafio devido ao pequeno tamanho e à complexidade do sistema, o qual inclui também fenômenos dinâmicos. Vários parâmetros têm sido considerados, os quais têm impacto direto na estabilidade e na cinética de liberação: distribuição de tamanho da partícula, potencial zeta (determinação da carga de superfície), análises morfológicas, determinação da quantidade de fármaco (total, associado e livre), determinação do peso molecular, estudos de estabilidade (efeitos de estocagem em função do tempo) e caracterização estrutural (Guterres *et al.*, 1995; Ciftci *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000; Tunçay *et al.*, 2000; Beck, 2000; Konno *et al.*, 2001; Kim e Lee 2001; Jalón *et al.*, 2001; Schaffazick *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que, do ponto de vista farmacêutico, torna-se de fundamental importância o conhecimento do comportamento reológico, para que a atividade terapêutica ou as funções dermatológicas dos produtos sejam asseguradas (Woolfson *et al.*, 2000). O estudo do comportamento reológico dos sistemas e a determinação das medidas de viscosidade podem ser utilizadas com o objetivo de quantificar os efeitos provocados pelo tempo, pela temperatura, pela incorporação de substâncias ativas ou carreadores como lipossomas, ciclodextrinas e sistemas nanoparticulados em produtos semi-sólidos (Lucero *et al.*, 1994a; Welin-Berger *et al.*, 2001; Pavelic *et al.*, 2001; Shawesh, *et al.*, 2003; Booulmedarat *et al.*, 2003; Milão *et al.*, 2003).

Considerando o exposto, o capítulo 1 desta tese compreende dois artigos, o primeiro uma revisão sobre as propriedades reológicas de formulações farmacêuticas e

cosméticas (a ser submetido para publicação) e o segundo, experimental, que apresenta o desenvolvimento e caracterização dos sistemas nanoestruturados contendo nimesulida incorporadas em géis hidrofílicos (publicado no periódico Die Pharmazie).

PUBLICAÇÃO 1

***Propriedades Reológicas no Desenvolvimento de Formulações Semi-sólidas
Farmacêuticas e Cosméticas: Fundamentação Teórica e Exemplos Práticos***

Artigo a ser submetido ao periódico Acta Farmacéutica Bonaerense

Propriedades Reológicas no Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas e
Cosméticas: Fundamentação Teórica e Exemplos Práticos

Marta P. Alves

Sílvia S. Guterres*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Adriana R. Pohlmann

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal de Rio
Grande do Sul, CP 15003, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência: Tel: (051) 3316-5500

Fax: (051) 3316-5437. E-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

ABSTRACT

This article presents an overview about the rheology and spreadability of pharmaceutical and cosmetic products. Theoretical concepts as well as practical applications are described in order to allow an ease comprehension of the impacts of the rheological properties on the physico-chemical and biological characteristics of formulations.

KEY-WORDS: Rheology, spreadability, viscosity, topical formulations

INTRODUÇÃO

A reologia é um ramo da física que estuda a viscosidade, a plasticidade, a elasticidade, o escoamento e a deformação da matéria sobre ação de forças. Neste âmbito, a viscosidade é uma expressão da resistência ao fluxo de um fluido, uma vez que quanto maior a viscosidade maior a resistência do líquido para escoar (Martin *et al.*, 1993; Briceño, 2000).

Análises reológicas são fundamentais para os estudos de Tecnologia Farmacêutica, sendo imprescindíveis no desenvolvimento de formulações (Briceño, 2000) e na caracterização físico-química de produtos farmacêuticos, tais como pastas, emulsões, cremes, géis, suspensões, supositórios, revestimento de comprimidos e em vários outros produtos (Martin *et al.*, 1993; Lieberman *et al.*, 1996; Lima, 2000; Netz e Ortega, 2002). O comportamento reológico de um sistema e a determinação das medidas de viscosidade (viscosimetria) (Lieberman *et al.*, 1996) são utilizados em vários estudos com o objetivo de quantificar, em produtos semi-sólidos (Lucero *et al.*, 1994; Welin-berger *et al.*, 2001; Pavelic *et al.*, 2001; Shawesh *et al.*, 2003; Booulmedarat *et al.*, 2003; Milão *et al.*, 2003), os efeitos provocados pelo tempo, pela temperatura, pela incorporação de substâncias ativas e de carreadores como lipossomas, ciclodextrinas e sistemas nanoparticulados. Os estudos reológicos podem influenciar não só na etapa de desenvolvimento e de produção, bem como na garantia da qualidade, assegurando que as características do produto sejam reproduzidas e mantidas em todos os lotes, seguindo um padrão pré-determinado (Martin *et al.*, 1993).

O controle da viscosidade em função do tempo é também uma forma de monitorar indiretamente a degradação química, ou seja, modificações em nível molecular podem produzir mudanças na viscosidade (Lieberman *et al.*, 1996). As alterações de viscosidade durante o período de armazenamento, também podem ser produzidas por mudanças na microestrutura da formulação (floculação, coalescência ou sedimentação) (Lieberman *et al.*, 1996), podendo significar sinais de instabilidade físico-química nas formulações (Gasperlin *et al.*, 1998).

Desta forma, as características reológicas de um produto definem várias situações práticas, que vão desde a facilidade com a qual um material pode ser retirado de um frasco (Martin *et al.*, 1993), ser pressionado em um tubo (Gennaro, 2000), espalhado sobre a pele, ou bombeado através de equipamentos, onde a mistura ou o processo de envase são realizados (Briceño, 2000; Lachman *et al.*, 2001). Assim, o objetivo central dos estudos reológicos aplicados aos sistemas semi-sólidos é a descrição das relações entre as tensões e as deformações, principalmente nos produtos para aplicação tópica, através das designadas leis constitutivas ou de comportamento (Almeida e Bahia, 2003).

Cabe ressaltar que, do ponto de vista farmacêutico, torna-se de fundamental importância o conhecimento do comportamento reológico, visto que um adequado fluxo dos sistemas é exigido para que a atividade terapêutica, ou as funções cosméticas do produto, sejam asseguradas (Woolfson *et al.*, 2000).

Face ao exposto, este artigo tem como objetivo revisar conceitos fundamentais de reologia, exemplificando os vários comportamentos reológicos assumidos pelos diferentes sistemas dispersos, utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas.

REOLOGIA

A reologia é o estudo do comportamento de fluidez da matéria, refere-se à parte da físico-química que trata da deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semi-sólidos, incluindo propriedades, tais como, elasticidade, viscosidade e plasticidade.

1. Viscosidade

1.1. Conceitos fundamentais

A viscosidade é a medida da resistência interna de uma substância ao fluxo, quando submetido a uma tensão. Diz-se que a deformação é elástica se o material readquire a sua forma inicial após a força ser retirada, ou plástica, se a deformação permanecer (Lachman *et al.*, 2001).

Geralmente, o escoamento de um fluido não é descrito pelo movimento individual de cada uma de suas partículas, mas é especificado por sua densidade e velocidade de escoamento ou fluxo v , numa posição r e num instante t (Okuno *et al.*, 1982).

A taxa de cisalhamento ou gradiente de velocidade (γ) corresponde à variação da velocidade de deslocamento (dv) representando a diferença de velocidade entre os dois planos do líquido (cm/seg) em função da altura da camada molecular (dr) (Figura 1), correspondendo à distância entre dois planos paralelos (cm), indicando a taxa com que o líquido escoar, quando uma determinada força é aplicada (Gennaro, 2000; Martin *et al.*, 1993).

$$\gamma = \frac{dv}{dr} \quad (1)$$

A pressão aplicada (força por unidade de área) é também denominada de tensão de cisalhamento (τ), tendo como unidade Newton/m² ou Pascal (Schramm, 2000; Almeida e Bahia, 2003).

A unidade mais utilizada para a determinação da viscosidade de soluções aquosas diluídas é o centiPoise (cP, ou seja 0,01 Poise). No sistema internacional, a unidade da viscosidade correspondente ao cP é o miliPascal.segundo (mPa.s). Um Poise pode ser definido pela força de 1 dina aplicada sobre uma placa, produzindo-se uma velocidade de 1cm.s⁻¹, sendo à distância entre as duas placas de 1 cm e a área das duas placas de 1 cm² cada (Lachman *et al.*, 2001).

Para quantificar a reologia dos fluídos, a tensão de cisalhamento é medida em função da taxa de cisalhamento, e a representação gráfica entre a relação de tensão *versus* a taxa de cisalhamento é denominada *Reograma* (Briceño, 2000; Wilkinson e Moore, 1990). Portanto, a viscosidade pode ser definida como:

$$Viscosidade(poise) = \frac{Tensão\ de\ cisalhamento\ dina / cm^2}{Taxa\ de\ cisalhamento\ s^{-1}} \quad (2)$$

Nas aplicações farmacêuticas e cosméticas a taxa de cisalhamento pode ser determinada quando um produto é aplicado sobre a pele ou quando várias operações farmacêuticas são realizadas, sendo que cada produto deve apresentar características reológicas adequadas à sua finalidade. Alguns valores característicos encontrados para taxa de cisalhamento em operações farmacêuticas e cosméticas são apresentados na Tabela 1 (Brummer e Godersky, 1999; Gennaro, 2000; Lachman *et al.*, 2001).

Tabela 1. Taxas de deformação aproximadas para operações farmacêuticas e cosméticas.

Operação	Velocidade ou taxa de cisalhamento (s⁻¹)
Remoção de recipientes	10 – 10 ²
Extrusão de dentrificio da bisnaga	10 ²
Espalhabilidade de loções e cremes na pele	10 ² – 10 ⁴
Injeção com seringa hipodérmica	4 x 10 ³
Processamento de produtos em moinho coloidal	10 ⁵ - 10 ⁶
Suspensão de pigmentos e substâncias ativas	10 ⁻³ - 10 ⁻¹
Dispensação de <i>spray</i> nasal	2 x 10 ⁴
Espatulação (preparação de pomadas)	1,5 x 10 ²
Moinho de rolos	10 ³ – 1,2 x 10 ⁴
Enchimento a velocidade elevada	5 x 10 ³ – 10 ⁵
Bombeamento dos produtos (relacionado com o tamanho do orifício)	10 ³ – 10 ⁵
Aplicação de batom e esmalte de unha	10 ³ – 10 ⁵

O conhecimento da taxa de cisalhamento também é importante na seleção dos equipamentos a serem utilizados em processos de dispersão (Briceño, 2000), os quais podem influenciar diretamente na viscosidade final das preparações (Wilkinson e Moore, 1990). A escolha do equipamento a ser utilizado na produção de emulsões, dependerá das características apresentadas pelo produto a ser fabricado. Agitadores com hélice e turbina são usados para preparações com baixa e média viscosidade. Para emulsões semi-sólidas

com alta viscosidade, agitadores capazes de retirar o conteúdo de produto aderido às paredes são preferidos. Quando altas velocidades de cisalhamento são necessárias para produção de formulações semi-sólidas com pequeno tamanho de partícula, misturadores ultrassônicos, moinhos coloidais ou homogenizadores são empregados (Becker, 1985).

1.2. Comportamentos reológicos

De acordo com o comportamento assumido pelos sistemas, os fluxos podem ser classificados em fluídos newtonianos e não-newtonianos.

1.2.1. Fluídos newtonianos

O fluxo newtoniano caracteriza-se por apresentar viscosidade constante, independente da taxa de cisalhamento (Ansel *et al.*, 1999) (Figura 2a). Segundo a lei de Newton (Eq. 3), para os líquidos ideais, a tensão de cisalhamento (τ) é diretamente proporcional à taxa cisalhamento ($\dot{\gamma}$). Desta forma, para todos os valores considerados, o coeficiente angular da equação da reta corresponderá ao coeficiente de viscosidade η , que é uma medida da resistência do material ao escoamento (Lieberman *et al.*, 1996; Briceño, 2000). Para este tipo de fluido a viscosidade é independente da velocidade de deformação, o que só é verdadeiro para líquidos ideais como os designados fluidos newtonianos.

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (3)$$

Normalmente, os materiais que apresentam comportamento newtoniano são materiais quimicamente puros ou são soluções de solutos de massa molar reduzida. A

água, a glicerina, tinturas e óleos vegetais utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas são alguns exemplos de fluídos newtonianos (Briceño, 2000; Allen, 2004).

1.2.2. Fluídos não-newtonianos ou fluídos de Stokes

Nos fluídos não-newtonianos não se verifica uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicada. Este comportamento é observado em um grande número de sistemas, cujo interesse encontra-se no âmbito farmacêutico, tais como suspensões, suspensões coloidais, emulsões, pomadas e géis (Briceño, 2000; Allen, 2004).

Em geral, não é possível caracterizar um sistema não-newtoniano através de uma única medida. As curvas resultantes destas análises podem passar todas através de um ponto específico do reograma (tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento) para os diferentes materiais considerados (pseudoplásticos, dilatante e newtoniano) (Lachman *et al.*, 2001). Neste ponto de convergência, todos os materiais apresentam a mesma viscosidade aparente, mas nos demais pontos a viscosidade assume valores diferentes (Figura 3). Os valores determinados para cada ponto, são normalmente referidos como viscosidade aparente, sendo que o valor mencionado diz respeito às condições de realização da medida. Uma loção ou uma pasta podem apresentar valores de viscosidade semelhantes (Figura 3), os quais não apresentam significados físicos a menos que a taxa de cisalhamento seja mencionada (Martin *et al.*, 1993). Os diferentes tipos de escoamento traduzem os diferentes comportamentos reológicos apresentados pelos produtos (Allen, 2004).

Nos sistemas não-newtonianos, a extensão das interações entre as partículas é a principal responsável pela complexidade do comportamento reológico das preparações. Desta forma, os fluxos podem assumir vários comportamentos, determinando diferentes tipos de reogramas, tais como: plástico (Corpo de Bingham); pseudoplástico descrito pela lei da potência (reofluídificantes e reoespessantes), pseudoplástico com valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite; dilatante e dilatante com valor de cedência ou com tensão de cisalhamento limite (volume alterado) (Lieberman *et al.*, 1996; Lachman *et al.*, 2001; Almeida e Bahia, 2003).

Comportamento plástico

A principal característica dos sistemas que apresentam comportamento plástico é a necessidade de uma força prévia para iniciar o fluxo das camadas moleculares (Lachman *et al.*, 2001) (Figura 2b). O valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite é obtido pela extrapolação da linha tangente à região linear da curva (Martin *et al.*, 1993; Netz e Ortega, 2002).

Esse tipo de comportamento pode ser expresso matematicamente pela equação 4, determinando a viscosidade plástica (η):

$$\eta = \frac{\tau - \tau_0}{\dot{\gamma}} \quad (4)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento e τ_0 é o valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite.

Geralmente após ser atingida uma tensão de cisalhamento limite (τ_0), os sistemas plásticos passam a ter um comportamento linear ou de um líquido newtoniano. O valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite, sobretudo, tem importância em preparações para as quais se pretende manter a forma original do produto, até atingir tensão suficiente para que o mesmo seja espalhado sobre a pele ou mucosa. O valor de cedência (*yield value*) é uma propriedade apresentada por determinadas dispersões, como, por exemplo, em pomadas com vaselina, parafina, ceras e sílica (Prista, 1995).

O fluxo plástico está associado à presença de partículas floculadas em suspensões concentradas. O valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite está presente devido às interações entre as partículas adjacentes através de forças de baixa interação tipo van der Waals, que devem ser rompidas antes do fluxo começar a escoar. Conseqüentemente, o valor de cedência é uma indicação do grau de floculação, uma vez que um aumento na estrutura requer uma força maior para que o fluxo do sistema seja iniciado (Martin *et al.*, 1993; Briceño, 2000).

Algumas suspensões poliméricas espessas apresentam comportamento viscoplástico mais complexo, ou seja, apresentam pseudoplastia acima da tensão de cisalhamento limite (Briceño, 2000).

Comportamento pseudoplástico

O fluxo é iniciado e a viscosidade varia com o aumento da tensão, ou seja, o material começa a fluir quando uma tensão de cisalhamento é aplicada (Almeida e Bahia, 2003) (Figura 2c). A inclinação da curva diminui gradualmente com o aumento da taxa de

cisalhamento (Marriott, 2005). Vários sistemas coloidais, especialmente soluções poliméricas, dispersões floculadas, formas semi-sólidas contendo concentrações significativas de metilcelulose, carboximetilcelulose, carbômero, alginatos e várias gomas, tornam-se mais fluídas quando agitadas (Martin *et al.*, 1993; Gennaro, 2000). Neste tipo de sistema ocorre uma diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação. Nenhuma parte da curva é linear, não podendo a viscosidade ser expressa por um simples valor, o que leva a uma viscosidade aparente para cada valor da taxa de cisalhamento (Gennaro, 2000; Lachman *et al.*, 2001).

Várias formulações farmacêuticas e cosméticas apresentam este comportamento, especialmente géis (Owen *et al.*, 2000; Ivens *et al.*, 2001; Shawesh *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2004), emulsões (Korhonem *et al.*, 2000; Gaspar e Maia Campos *et al.*, 2003; Mambro *et al.*, 2003; Bushe *et al.*, 2005) e suspensões constituídas com partículas de diâmetros inferiores a 1 μm (Korhonem *et al.*, 2000; Booulmedarat *et al.*, 2003). A pseudoplastia é reversível em certo grau, ou seja, em repouso por um tempo suficiente, o fluido recupera a maior parte da sua forma original. A magnitude do efeito pseudoplástico é variável com a identidade do produto, não sendo rara a queda de 25 % na viscosidade, quando se duplica a taxa de cisalhamento. Existem certos fluidos pseudoplásticos que podem manifestar algum grau de elasticidade (Wilkinson e Moore, 1990).

O fluxo pseudoplástico pode ser caracterizado pela ruptura progressiva da estrutura do meio, quando a taxa de cisalhamento é aumentada (Ramirez *et al.*, 1999). Nas dispersões poliméricas a concentração, o emaranhado de macromoléculas (Gupta; Garg,

2002) e a imobilização do solvente definem a estrutura e, conseqüentemente, o comportamento reológico (Dolz *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 1999). Por exemplo, as moléculas filiformes flexíveis de metilcelulose ou de polivinilpirrolidona em solução aquosa interagem constantemente com as moléculas de água circundantes através da agitação térmica. Isto causa o movimento contínuo dos segmentos de cadeias por translação e rotação ao redor das ligações entre átomos de carbono e oxigênio, que formam a cadeia principal do polímero. Ao aplicar a força ou tensão de cisalhamento, um movimento laminar unidirecional se sobrepõe ao movimento térmico das moléculas de água e dos segmentos de cadeias. As cadeias de polímeros, que formam espirais, tendem a separar-se e alinhar-se na direção do fluxo (Gennaro, 2000). Como a tensão de cisalhamento é aumentada, as moléculas normalmente dispersas começam a alinhar-se em direção ao fluxo. Esta orientação reduz a resistência interna do material.

Obviamente, comparações entre diferentes sistemas pseudoplásticos são mais difíceis do que entre sistemas newtonianos ou plásticos. Os sistemas newtonianos são perfeitamente descritos pela viscosidade (η), sendo que a tensão de cisalhamento (τ) é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) (Gennaro, 2000). Pelo que foi visto anteriormente, os sistemas plásticos são adequadamente descritos pelo valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite e pela viscosidade plástica (Lieberman *et al.*, 1996). Várias aproximações têm sido usadas para obtenção de parâmetros significativos, que permitam a comparação entre diferentes materiais pseudoplásticos (Martin *et al.*, 1993).

Alguns fluídos com características reofluidificantes (*shear thinning*) ou reoespessantes (*shear thickening*) comportam-se de acordo com a lei da potência (Eq. 5).

O comportamento viscoso de um sistema, não pode ser caracterizado por um único valor, sendo freqüente recorrer a uma equação de estado. Equações exponenciais têm sido usadas freqüentemente para descrever sistemas pseudoplásticos (Dolz *et al.*, 1998; Briceño, 2000; Almeida e Bhaia, 2003; Kim *et al.*, 2003). Os parâmetros K e n podem ser usados para a caracterização de formulações, assim como o ponto de cedência ou tensão de cisalhamento limite e a viscosidade plástica podem ser usados para caracterização das formulações plásticas (Martin *et al.*, 1993).

$$\tau = K\gamma^n \quad (5)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de cisalhamento, n é o índice de plasticidade ou coeficiente de fluxo, K é o coeficiente de consistência. Para linearização aplicam-se logaritmos a ambos os membros da equação, originando a equação 6.

$$\log \tau = \log K + n \log \gamma \quad (6)$$

O coeficiente angular n é denominado índice de escoamento e relaciona-se com o comportamento da curva, indicando o grau de pseudoplastia do material. O valor de n demonstra o desvio em relação ao comportamento newtoniano. Fluidos newtonianos apresentam um valor de $n = 1$. Quanto mais próximo de 1, menor a pseudoplastia. Se n for menor que um ($n < 1$), o fluxo é considerado pseudoplástico (reofluidificante). Por outro lado, se n for maior que um ($n > 1$), o fluido é considerado reoespessante (Briceño, 2000; Almeida e Bhaia, 2003).

A constante K é denominada coeficiente de consistência, estando relacionada com a própria viscosidade do produto e é representada pelas unidades de viscosidade (Briceño, 2000; Kim *et al.* 2003).

Comportamento dilatante

Alguns sistemas podem apresentar comportamento dilatante, os quais caracterizam-se pelo aumento da viscosidade, quando a tensão de cisalhamento é aumentada (Figura 2d). Em repouso, as partículas estão muito próximas e encontram-se envolvidas com um volume mínimo de veículo. Os espaços interparticulares são reduzidos e a quantidade de veículo presente é apenas a necessária para os preencher. Quando a suspensão é agitada, o espaço entre as partículas aumenta e a quantidade de veículo torna-se insuficiente para assegurar a lubrificação de todas as partículas. Isto resulta em um aumento da resistência ao escoamento e, conseqüentemente, da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento (Martin *et al.*, 1993). De acordo com alguns autores, este sistema é caracterizado por um aumento de volume, o que torna o comportamento dilatante diferente de um reoespessante (*shear thickening*) (Lieberman *et al.*, 1996; Netz e Ortega, 2002).

O modelo mais adequado para descrever um fluido viscoplástico dependerá da resposta do fluxo à deformação e do ajuste dos dados experimentais, de acordo com os modelos convencionais utilizados (Bingham, Casson, Ostwald ou Herschel-Bulkley) (Briceño, 2000; Kim *et al.*, 2003), conforme a Tabela 2. Os diferentes tipos de comportamento reológico não-newtoniano, podem ser descritos por equações

matemáticas relativamente simples. O fluxo de Bingham (Eq. 7, Tabela 2) requer uma força prévia (valor de cedência ou tensão de cisalhamento mínima) para começar a escoar, comportando-se como um fluido newtoniano após este valor (Lieberman *et al.*, 1996). No modelo de Casson (Eq. 8, Tabela 2), a raiz quadrada da tensão de cisalhamento é representada em função da raiz quadrada da taxa de cisalhamento. A interseção no eixo da tensão de cisalhamento fica melhor definida comparativamente a outras representações (Lachman *et al.*, 2001). Através do modelo de Ostwald (Eq. 5, Tabela 2), os parâmetros K e η , podem ser obtidos plotando-se $\log \tau$ versus $\log \dot{\gamma}$. O modelo de Herschel-Bulkley (Eq. 9, Tabela 2) apresenta um valor de cedência (limite de escoamento), mas, após este valor, segue a lei da potência. Através deste modelo, os parâmetros: valor de cedência ou tensão de cisalhamento limite (Pa), consistência (Pa.sⁿ) e índice da lei da potência, podem ser calculados (Lieberman *et al.*, 1996).

Tabela 2. Modelos de fluxo em função das curvas de tensão de cisalhamento (τ) versus taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), equações e parâmetros.

Modelos	Equação	Parâmetros	
Bingham	$\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$ (7)	τ_0	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		η	Viscosidade (Pa.s)
Casson	$\tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + \eta^{0,5}\dot{\gamma}^{0,5}$ (8)	τ_0	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		η	Viscosidade (Pa.s)
Ostwald	$\tau = K\dot{\gamma}^n$ (5)	K	Consistência (Pa.s ⁿ)
		n	Índice da lei da potência
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$ (9)	τ_0	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		K	Consistência (Pa.s ⁿ)
		n	Índice da lei da potência

1.3. Tixotropia

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pelo *loop* de histerese que se caracteriza pela área entre as curvas ascendente e descendente (Figura 4), calculada através do reograma (gráfico da tensão *versus* taxa de cisalhamento) (Gennaro, 2000; Barry, 2005).

Em sistemas newtonianos, as curvas ascendentes e descendentes são retas, sobrepondo-se perfeitamente, não ocorrendo quebra de estrutura (rompimento do estado fundamental reológico) (Martin *et al.*, 1993; Gaspar e Maia Campos, 2003). A ausência de histerese nas curvas de fluxo acontece quando a reconstrução da estrutura por movimento browniano é mais rápida que a ruptura estrutural induzida por deslizamento ou o tempo de resposta do viscosímetro (Gennaro, 2000).

A tixotropia é um fenômeno que ocorre muito frequentemente nos sistemas dispersos (Lieberman *et al.*, 1996; Briceño, 2000). Caracteriza-se pela diminuição da viscosidade em função do tempo de deformação, sendo uma propriedade desejável em sistemas farmacêuticos. Como exemplo, pode-se citar os géis produzidos por polissacarídeos de elevada massa molecular, que são estabilizados por um grande número de ligações secundárias. Estes sistemas sofrem uma extensiva reorganização sob cisalhamento, sendo que a estrutura tridimensional é reduzida a uma estrutura bidimensional (Marriott, 2005). Os produtos tixotrópicos geralmente apresentam uma consistência maior na embalagem, podendo ser facilmente removido do frasco e espalhado no local de aplicação, após sofrer ação de uma força. As partículas são mantidas em suspensão (Lima, 2000), sendo este comportamento adequado para

emulsões, cremes, loções e pomadas. As emulsões, os cremes e as loções são constituídos por duas fases líquidas imiscíveis, uma dispersa na outra na forma de pequenas gotículas (Barry *et al.*, 2005). Essas formulações se diferenciam pela viscosidade, em geral, sendo os cremes formulações semi-sólidas e as loções tanto semi-sólidas quanto líquidas. As pomadas são preparações gordurosas, semi-sólidas, geralmente anídras, contendo fármacos dissolvidos ou dispersos (Barry *et al.*, 2005).

A adição de um agente tixotrópico (magma de bentonita sódica, celulose microcristalina, entre outros) na formulação é uma boa alternativa farmacotécnica para que a sedimentação e a formação do fenômeno de cremagem nas emulsões sejam evitadas. Este tipo de procedimento proporciona um aumento da viscosidade quando o produto encontra-se em repouso (Gennaro, 2000).

Por sua vez, antitixotropia caracteriza-se pelo aumento da viscosidade com o tempo de deformação (Lieberman *et al.*, 1996; Netz e Ortega, 2002). A tixotropia e a antitixotropia geralmente são reversíveis, o fluido retorna à sua viscosidade inicial e estrutura original, após algum tempo quando a deformação é cessada, sendo que esta recuperação pode ser rápida ou lenta. A medida desta recuperação é dada pela área sob a curva de histerese. Quando o corpo não recuperar completamente a sua estrutura inicial, após um estado de repouso suficientemente prolongado, pode se falar em tixotropia ou antitixotropia parcial. Os termos *reomalaxe* ou *reopexia* definem, respectivamente, os fenômenos de fluidificação e espessamento irreversíveis (Gennaro, 2000). Este tipo de comportamento pode ser exemplificado em determinados casos de solvência, por

intervenção química, podendo levar à fluidificação do sistema (*reomalaxe*), enquanto que no envelhecimento de loções é freqüente ocorrer *reopexia* (Almeida e Bahia, 2003).

2. Reologia dos sistemas dispersos farmacêuticos e cosméticos

2.1 Importância

A determinação das propriedades reológicas de um sistema disperso é fundamental para o desenvolvimento tecnológico, pois as características reológicas podem influenciar a estabilidade física do sistema (Mambro *et al.*, 2003), afetar o desempenho (Martinez *et al.*, 2003), a espalhabilidade, a absorção, as características sensoriais e as finalidades de uso (Penzes *et al.*, 2004).

Os estudos reológicos podem contribuir para a avaliação da influência que os processos de fabricação exercem na preparação das formulações, bem como otimizar o desenvolvimento de novos produtos, reduzindo o tempo destinado aos estudos de pré-formulação (Brummer e Godersky 1999). A determinação das propriedades reológicas de um sistema pode fornecer informações reais e versáteis sobre as propriedades estruturais de diferentes formas farmacêuticas e cosméticas utilizadas topicamente (Tabela 3) (Korhonen *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Eros *et al.*, 2003). Existem vários artigos na literatura referentes a estudos reológicos de produtos farmacêuticos e cosméticos, visando investigar as propriedades de fluxo destes sistemas (Lucero *et al.*, 1994a; Lucero *et al.*, 1994b; Dolz *et al.*, 1998; De Paula *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Mohammad *et al.*, 2004).

2.2 Avaliação reológica de produtos farmacêuticos e cosméticos

Os géis acrílicos são amplamente utilizados em formulações tópicas cutâneas e, de uma forma geral, apresentam comportamento não-newtoniano com características pseudoplásticas (*shear thickening*) sem tixotropia significativa (Lucero *et al.*, 1994a; Lucero *et al.*, 1994b; Ramirez *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2001; Shawesh *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). O comportamento reológico de géis preparados a partir de polímeros do ácido acrílico também tem sido estudado no que diz respeito à avaliação da influência de parâmetros como a concentração do polímero, o pH, o índice de plasticidade e a presença de substâncias incorporadas aos produtos. As curvas de fluxo destes géis têm sido ajustadas pelos modelos de Ostwald e de Herschel-Bulkley (Kim *et al.*, 2003; Güngör e Bergisadi, 2003). Os parâmetros de correlação demonstram que a lei da potência descreve adequadamente o comportamento reológico dos sistemas, obtendo-se índices de correlação superiores a 0,9900 (Contreras *et al.*, 2001).

O pH pode influenciar no comportamento pseudoplástico dos hidrogéis (Ramirez *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2001). A tendência do índice da lei da potência (n) em assumir um valor constante pode determinar quando a dispersão atinge uma estrutura tridimensional mais estável (consistência de gel), indicando através do valor de pH (neutralização) onde ocorre uma maior estruturação do sistema (Dolz *et al.*, 1998). O comportamento reológico das dispersões poliméricas é determinado não somente pela estrutura polímero-polímero (emaranhado reticular), mas também pela concentração e o efeito solvente-polímero. Estudos reológicos com géis de Carbopol 940® neutralizados

com trietanolamina e preparados empregando-se como co-solventes água, glicerina e propilenoglicol demonstraram que a complexidade da estrutura é aumentada em valores de pH mais elevados, em função da repulsão entre as cargas (Tabela 3) (Mohammad *et al.*, 2004). Observa-se, ainda, que a natureza pseudoplástica das preparações pode diminuir quando a concentração do agente de viscosidade é aumentada (Dolz *et al.*, 1998; Bentley *et al.*, 1999). Desta forma, a caracterização exaustiva do comportamento do fluxo destes sistemas, em função da neutralização e concentração do polímero, é essencial para a avaliação do potencial de uso desses veículos como bases dermatológicas (Ramirez *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2001).

As propriedades reológicas de diferentes géis contraceptivos e suas diluições, simulando o fluido vaginal foram avaliadas. Todos os produtos exibiram comportamento não-newtoniano com fluido pseudoplástico (*shear thinning*) (Owen *et al.*, 2000). Quando os géis foram diluídos a plasticidade foi reduzida, com a redução da plasticidade, a espalhabilidade e a capacidade de retenção podem ser alteradas quando os produtos forem usados *in vivo* (Tabela 3). As propriedades reológicas conseqüentemente governam as funções de espalhabilidade e retenção destes géis na superfície vaginal. Estes produtos quando aplicados no epitélio vaginal devem espalhar-se, ficando retidos por um período suficientemente longo para promover uma adequada proteção contra doenças provocadas por bactérias e vírus. Esta proteção se deve tanto à capacidade de liberação de compostos bioativos, tais como microbicidas, bem como à formação de uma barreira física de proteção contra infecções.

Estudos reológicos também têm sido realizados com sistemas emulsionados com o objetivo de investigar a possibilidade de desenvolvimento de produtos tópicos que permitam uma máxima liberação de substâncias ativas com consistência satisfatória e plasticidade aparente adequada (Tamura *et al.*, 1997; Welin-Berger *et al.*, 2001; Eros *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2004).

Emulsões e suspensões para uso cosmético são sistemas complexos, os quais podem apresentar várias interações entre tensoativos, polímeros e outros excipientes, apresentando propriedades reológicas de acordo com o sistema reticular formado entre os constituintes (Korhonen *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2004). Estes sistemas podem exibir características viscoelásticas, dependendo da fração do volume da gota ou distribuição do tamanho da partícula e a viscosidade da fase dispersa. No caso das emulsões, o filme interfacial formado, a concentração e natureza dos agentes emulsificantes poderão modificar o comportamento reológico destas preparações (Woolfson *et al.*, 2000). Experimentos realizados com 300 formulações de cremes com diferentes composições demonstraram que essas apresentaram comportamento viscoelástico e tixotropia (Eros *et al.*, 2003) (Tabela 3). Estudos também foram realizados determinando as características reológicas apresentadas por emulsões A/O e O/A testando diferentes tensoativos (monoestearato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano e monooleato de sorbitano) e componentes oleosos como palmitato e miristato de isopropila. Ambos os sistemas apresentaram tixotropia, sendo que as emulsões A/O apresentaram comportamento reoespessante (*shear thickening*) e as emulsões O/A

comportamento reofluidificante, pseudoplástico (*shear thinning*) (Tabela 3) (Korhonem *et al.*, 2002).

Análises reológicas também assumem importância fundamental nos estudos de liberação e permeação de fármacos. Os parâmetros reológicos podem influenciar a consistência, a espalhabilidade, a retenção no sítio de aplicação, os atributos sensoriais e a liberação de fármacos (Woolfson *et al.*, 2000; Penzes *et al.*, 2004). Experimentos realizados com um anestésico tópico (isopropil-metil-[2-(3-propoxi-fenil)-etil]-amina) em emulsão (O/A) demonstraram que o aumento na macroviscosidade das formulações afeta negativamente a liberação e a permeação do ativo. As taxas de liberação e permeação de substâncias com baixa solubilidade em água são diminuídas, quando os valores de cedência ou tensão de cisalhamento limite são aumentados por adição de polímeros gelificantes, desde que a difusão do fármaco seja impedida em função das características estruturais assumidas (Welin-Berger *et al.*, 2001).

Devido à grande variedade de protetores solares no mercado, também para estes produtos, torna-se de extrema relevância o estudo de parâmetros reológicos, os quais podem auxiliar no desenvolvimento de métodos rápidos, simples e seguros para análise desta categoria de produtos cosméticos. O Fator de Proteção Solar (FPS) depende do comportamento reológico da preparação em que os filtros solares encontram-se incorporados. Em geral, formulações solares com fluxo pseudoplástico produzem um filme protetor satisfatório, recobrando a superfície da pele e distribuindo o filtro uniformemente com uma espessura adequada, propiciando desta forma um aumento do FPS (Gaspar e Maia Campos, 2003).

As propriedades mecânicas e reológicas dos sistemas dispersos farmacêuticos não são bem entendidas como nos sistemas newtonianos, especialmente quando as partículas da fase dispersa interagem entre si (Lieberman *et al.*, 1996). A consistência dos sistemas semi-sólidos deriva da soma e da interferência recíproca de diversos fatores, como as forças de coesão e adesão, elasticidade, viscosidade, tixotropia, estrutura micelar, tamanho de partícula, dentre outros (Prista, 1995; Ribeiro *et al.*, 2004). Como pode-se verificar na Tabela 3 as propriedades físico-químicas, especialmente composição e reologia, podem ser usadas com o objetivo de prover dados científicos para a classificação e distinção das formas farmacêuticas tópicas em relação ao comportamento assumido por estas preparações (Buhse *et al.*, 2005). Entretanto, cabe salientar que os estudos realizados até o momento utilizam metodologias e parâmetros de avaliação profundamente dependentes das características específicas dos produtos em análise, não representando um conjunto de análises padronizado. Desta forma, uma comparação direta entre as formulações semi-sólidas é difícil e generalizações não podem ser levantadas.

Tabela 3. Exemplos de comportamentos reológicos em produtos farmacêuticos e cosméticos.

Forma Farmacêutica ou Cosmética (referência)	Comportamentos Reológicos		
Gel hidroalcoól. (15%) Carb. Ultrez TM10® (Contreras <i>et al.</i> , 2001)	Não-newtoniano, fluxo pseudoplástico (n<1) - Modelo de Ostwald		
Gel hidroalcoól. (30%) Carb. Ultrez TM10® (Ramirez <i>et al.</i> , 1999)	Não-newtoniano, (n<1) -Modelo de Ostwald/ sem tixotropia		
Hidrogel/Carb. 941® /várias concentrações (Kim <i>et al.</i> , 2003)	Não-newtoniano, pseudoplástico com valor de cedência - Modelo de Herschel-Bulkley		
Hidrogel/Carbopol-940® (Dolz <i>et al.</i> , 1998)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n<1) - Modelo de Ostwald/ sem tixotropia		
Hidrogel/Carbopol-940®/α-tocoferol (Lucero <i>et al.</i> , 1994a)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n<1) - Modelo de Ostwald/ sem tixotropia		
Hidrogel/Carbopol-940®/ tretinoína (Lucero <i>et al.</i> , 1994b)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n<1) - sem tixotropia significativa		
Carbopol ETDTM2001 /Indometacina (Shawesh <i>et al.</i> , 2003)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n<1) - Modelo de Ostwald		
Emulsion O/A-CMC 0,1 % (Welin-Berger <i>et al.</i> , 2001)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n= 0,82) – Modelo de Herschel-Bulkley		
Emulsion O/A – CMC 1 % (Welin-Berger <i>et al.</i> , 2001)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n= 0,70) – Modelo de Herschel-Bulkley		
Emulsion O/A -Carbopol 934® 0,1%/(AD) (Welin-Berger <i>et al.</i> , 2001)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n= 0,78) – Modelo de Herschel-Bulkley		
Emulsion O/A -Carbopol 934® 1%/(AD) (Welin-Berger <i>et al.</i> , 2001)	Não-newtoniano, pseudoplástico (n= 0,65) – Modelo de Herschel-Bulkley		
Creme A/O não-iônico (Korhonem <i>et al.</i> , 2002)	Não-newtoniano, pseudoplástico, reoespessante (<i>shear thickening</i>)/ com Tixotropia		
Creme O/A não-iônico (Korhonem <i>et al.</i> , 2002)	Não-newtoniano, pseudoplástico, reofluidificante (<i>shear thinning</i>)/ com Tixotropia		
Creme O/A (álcool cetosteárilico, vaselina) (Eros <i>et al.</i> , 2003)	Não-newtoniano, plástico/ sem tixotropia		

Forma Farmacêutica ou Cosmética	Temperatura	Consistência (K) (Pa.sn)	Índice de plasticidade (n)
Carbopol-980®/pH 5,1 (Mohammad <i>et al.</i> , 2004)	5 °C	93,0	0,17
	25 °C	87,7	0,14
	65 °C	85,7	0,11
Carbopol-980®/pH 6,3 (Mohammad <i>et al.</i> , 2004)	5 °C	124,2	0,18
	25 °C	116,6	0,16
	65 °C	100,2	0,13
Carbopol-980®/pH 8,0 (Mohammad <i>et al.</i> , 2004)	5 °C	144,0	0,31
	25 °C	131,4	0,16
	65 °C	100,1	0,13

Formas de géis vaginais (Owen <i>et al.</i> , 2000)	Viscosidade (mPa . s ⁿ) 1.0 s ⁻¹	Índice de plasticidade (n)
Gynol II®-100%	94,1	0,255 (pseudoplástico)
KY Plus®-100%	121,3	0,174 (pseudoplástico)
Conceptrol®-100%	119,5	0,230 (pseudoplástico)
AdvancedS®-100%	54,06	0,190 (pseudoplástico)
Gynol II®-25%	0,4871	0,610 (pseudoplástico)
KY Plus®-25%	0,00308	1,026
Conceptrol®-25%	0,5959	0,537 (pseudoplástico)
Advange-S®-25%	0,00474	0,922 (pseudoplástico)

No que se refere às formulações de base nanotecnológica, as análises reológicas também são importantes. Com o objetivo de determinar a liberação tópica de fármacos, e também para caracterizar formulações semi-sólidas contendo sistemas nanoestruturados, como lipossomas, nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões e ciclodextrinas, alguns trabalhos foram realizados (Booulmedarat *et al.*, 2003; Pavelic *et al.*, 2001; Milão *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2005). Geralmente as formulações nanoestruturadas são incorporadas a veículos hidrofílicos e apresentam comportamento não newtoniano, plástico ou pseudoplástico (Tabela 4).

Tabela 4. Exemplos de comportamentos reológicos em sistemas nanoestruturados

Sistemas nanoestruturados	Veículo	Comportamento reológico	Referências
Lipossomas	Hidrogel Carbopol® 974P NF	Não-newtoniano, fluxo pseudoplástico	(Booulmedarat <i>et al.</i> , 2003)
Ciclodextrina (Metil- β -ciclodext.)	Hidrogel Carbopol® 974P NF	Não-newtoniano, fluxo pseudoplástico	(Booulmedarat <i>et al.</i> , 2003)
Lipossomas (calceína)	Hidrogel Carbopol® 974P NF	Não-newtoniano, fluxo plástico (modelo de Bingham)	(Pavelic <i>et al.</i> , 2001)
Lipossomas (calceína)	Hidrogel Carbopol® 980 NF	Não-newtoniano, fluxo plástico (modelo de Casson)	(Pavelic <i>et al.</i> , 2001)
Nanocápsulas (diclofenaco)	Hidrogel Carbopol® 940	Não-newtoniano, fluxo plástico (modelo de Casson)	(Milão <i>et al.</i> , 2003)
Nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões (nimesulida)	Hidrogel Carbopol® 940	Não-newtoniano, fluxo pseudoplástico (modelo de Ostwald)	(Alves <i>et al.</i> , 2005)

Em função da complexidade dos sistemas nanoestruturados e a recente utilização destes carreadores em produtos tópicos, tornam-se cada vez mais necessárias que análises reológicas sejam realizadas, com o objetivo de elucidar as possíveis interações entre estes sistemas e os diferentes veículos empregados. Assegurando-se desta forma, uma efetiva atividade terapêutica e cosmética para este tipo de preparação.

3. Espalhabilidade

A eficácia da terapia dos produtos administrados na pele também dependerá da aplicação do paciente através da distribuição de uma dose padrão (Ivens *et al.*, 2001). A espalhabilidade é uma característica importante neste tipo de formulação, sendo responsável pela transferência correta da dose no local de aplicação (De Paula *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2002). Vários autores têm avaliado a aplicabilidade de produtos, usando a equação teórica de fluxo laminar através do uso de placas paralelas. O método das placas paralelas é o mais amplamente empregado para determinar e quantificar a espalhabilidade de preparações semi-sólidas. Esse método consiste no uso de várias placas de vidro, com peso conhecido, que são colocadas subsequentemente sobre a amostra em intervalos de 1 minuto. As áreas de aplicação alcançadas pela amostra são medidas em milímetros nos eixos vertical e horizontal. Os resultados são expressos em termos da área de aplicação como uma função da massa aplicada, de acordo com a equação 10.

$$S_i = d^2 \frac{\pi}{4} \quad (10)$$

Onde S_i é a área de aplicação (mm) resultante da massa aplicada i (g) e d é o diâmetro médio (mm) alcançado pela amostra. A área de aplicação é plotada contra o peso das placas para obtenção dos perfis de aplicação (De Paula *et al.*, 1998). O diâmetro obtido através do experimento de espalhabilidade é considerado como uma medida adequada de consistência, dependendo das condições experimentais várias classificações de consistência podem ser adotadas em função do diâmetro alcançado (Vennat *et al.*, 1991; Lardy *et al.*, 2000).

Estudos têm correlacionado os valores alcançados nos testes de espalhabilidade com os valores de viscosidade (Lucero *et al.*, 1991a; Lucero *et al.*, 1991b; Lucero *et al.*, 1991c). Uma função linear entre os diâmetros obtidos nos testes de espalhabilidade e os valores de viscosidade encontrados para os géis de derivados de celulose foi relatada por Vennat e colaboradores (1992). Esses géis apresentaram características pseudoplásticas e não apresentaram tixotropia. A mesma correlação não foi estabelecida para os géis de carragenina, os quais não obtiveram linearidade entre os valores de espalhabilidade e viscosidade, sendo que, os mesmos apresentaram características pseudoplásticas, mas com tixotropia.

Um gel de Carbopol 940[®] com alfa-tocoferol foi desenvolvido e a influência de antioxidantes (ácido ascórbico e butilhidroxitolueno) sobre as características reológicas das formulações foi estudada (Lucero *et al.*, 1991c). A espalhabilidade para cada gel foi diferente, sendo consequência das reações produzidas entre o Carbopol 940[®], o ácido ascórbico e o butilhidroxitolueno (anti-oxidante). A adição destes

componentes pode determinar a reologia dos sistemas dispersos, alterando a espalhabilidade do gel durante o período de estocagem, em função das interações estabelecidas entre os componentes da formulação.

Os testes de extensibilidade em preparações semi-sólidas também auxiliam na seleção do excipiente ideal para cada substância ativa (Leon *et al.*, 1991). Isto se deve, entre outros fatores, aos tipos de ligações estabelecidas entre fármaco-excipiente, que poderão aumentar a consistência do produto e, subseqüentemente, diminuir a liberação da substância.

A composição do veículo em formulações tópicas pode influenciar a liberação do fármaco por mudanças na permeabilidade do estrato córneo na pele ou por aumento da atividade termodinâmica das substâncias. Estudos têm sido realizados relacionando-se a liberação de ativos com a viscosidade em formulações tópicas, sugerindo que quanto maior a viscosidade menor a liberação do fármaco (Güngör e Bergisadi, 2003; Gallagher *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

As análises reológicas de produtos farmacêuticos e cosméticos são essenciais no desenvolvimento, caracterização físico-química e controle de qualidade de novas formulações. O comportamento reológico de cada sistema é determinado pela sua composição quali-quantitativa, sendo, portanto, específico para cada produto. Por outro lado, essas mesmas propriedades reológicas são determinantes de características importantes como estabilidade físico-química, desempenho biofarmacêutico e aplicabilidade de cada formulação.

Variações na composição das formulações levarão a diferentes comportamentos, desde o simples comportamento newtoniano até os mais complexos, plástico, pseudo-plástico ou dilatante. A análise dos estudos reológicos descritos na literatura para diferentes produtos farmacêuticos ou cosméticos revela essa multiplicidade de comportamentos, evidenciando a necessidade de estudos específicos para cada desenvolvimento de produto, mediante o emprego de metodologias que dependem das características desse último.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Rede Nanobiotec/CNPq-MCT, Rede Nanocosméticos/CNPq-MCT e CNPq/Brasília/Brasil.

REFERÊNCIAS

- Allen, L.V.; Int. J. of Pharm. Compounding (ed. Bras.) **2004**, 6, 47.
- Almeida, I. F.; Bahia, M. F.; Cosmetics & Toiletries **2003**, 15, 96.
- Alves, P.A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A.R.; Pharmazie **2005**, 60(12), p. 900-4.
- Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen Jr.; Loyd, V.; **1999**, Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, Philadelphia: Lippincott, W.; Wilkins, p. 595.
- Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Lejeune, B.; Pourrat, A.; Drug Dev. Ind. Pharm. **1995**, 21, 1907.
- Barry, B. in Aulton Michael; Delineamento de Formas Farmacêuticas, **2005**, 2^a ed., Artmed: São Paulo.
- Becker, P.; Encyclopedia of Emulsion Technology: Applications in: Cosmetic Emulsions; Breuer, M. M.; Marcel Dekker-Taylor & Francis-CRC, **1985**.
- Bentley, M.V.L.B.; Marchetti, M. J.; Ricardo, N; Ali-Abi, Z.; Colett, J.H.; Int. J. Pharm. **1999**, 193, 49.
- Booulmedarat, L.; Grossiord, J. L.; Fattal, E.; Bochot, A.; Int. J. Pharm. **2003**, 254, 59.
- Briceño, M.I. Rheology of suspensions and emulsions In: Nielloud F, Marti-Mestres G (ed.) Pharmaceutical Emulsion and Suspensions, New York, p. 557-608 **2000**.
- Brummer, R.; Godersky, S.; Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. **1999**, 152, 89.
- Buhse, L. et al.; Int. J. Pharm. **2005**, 298, 101.
- Contreras, M. J. F.; Diéguez, A. R.; Soriano, M. M. J.; IL Fármaco **2001**, 56, 437.
- De Paula, I. C.; Ortega, G. G.; Bassani, V. L.; Petrovick, P. R.; Drug Dev. Ind. Pharm. **1998**, 24, 235.
- Dolz, M.; Herráez, M.; González, F.; Díez, O.; Delegido, J.; Hernández, M. J. Pharmazie **1998**, 53, 126.
- Eros, I.; Konia, M.; Csoka, I.; Int. J. Pharm. **2003**, 256, 175.

- Gallagher, D. J.; Trotter, L.; Heard, C. M.; *Int. J. Pharm.* **2003**, 268, 37.
- Garg, A.; Aggarwal, D.; Garg, S.; Singla, A.; *Pharm Technol.* **2002**, 26, 84.
- Gaspar, L.R.; Maia Campos, P.M.B.G.; *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 35.
- Gasperlin, M.; Tusar, L.; Tusar, M.; Kristl, J.; Smid-Korbar, J.; *Int. J. Pharm.* **1998**, 168, 243.
- Gennaro, A. R. *Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy*, Schott, H.; ed. Philadelphia, **2000**.
- Güngör, S.; Bergisadi, N.; *Pharmazie* **2003**, 58, 155.
- Gupta, P.; Garg S.; *Pharm Technol.* **2002**, 26(3), 144.
- Ivens, U. I.; Steinkjer, B.; Serup, J.; Tetens, V.; *British J. Dermatology* **2001**, 145, 264.
- Kim, J.; Song, J.; Lee, E.; Park, S.; *Colloid and Polymer Sci.* **2003**, 281, 614.
- Korhonen, M. et al; *Int. J. Pharm.* **2002**, 247, 103.
- Korhonen, M.; Niskanen, H.; Kiesvaara, J.; Yliruusi, J.; *Int. J. Pharm* **2000**, 197, 143.
- Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kang, J. L.; *Reologia Farmacêutica in Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*; Wood, J. H. ed.; Fundação Galauste Gulbenkian Lisboa, ed. **2001**.
- Lardy, F.; Vennat, B.; Pouget, M. P.; Pourrat, A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, 26, 715.
- Leon, M. J.; Lucero, M. J.; Millán, R.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, 17, 737.
- Lieberman, J. A.; Rieger, M. M.; Banker, G. S.; *Rheological and Mechanical Properties of Dispersed Systems in Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*; ed. Radebaugh, G. W. New York, 2rd ed., **1996**.
- Lima, E. M.; *Fármacos & Medicamentos.* **2000**, 4, 20.
- Lucero, M. J.; Vigo, J.; León, M. J.; *Int. J. Pharm.* **1994a**, 106, 125.
- Lucero, M. J.; Vigo, J.; León, M. J.; *Int. J. Pharm.* **1994b**, 111, 261.
- Lucero, M. J.; Vigo, J.; León, M. J.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994c**, 20, 2315.

Mambro, V.M.D.; Borin, M.F.; Fonseca, M.J.V.; J. Pharm. And Biom. Analysis, **2003**, 32, 97.

Marriott, C. in Aulton Michael; Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2a ed., Artmed: São Paulo, **2005**.

Martin, A.; Warbrick, J.; Cammarata, A.; Rheology in Physical Pharmacy; 4th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, **1993**.

Milao, D.; Knorst, M. T.; Guterres, S. S.; Pharmazie **2003**, 58, 325.

Mohammad T.I; Rodriguez-Hornedo, N.; Ciotti, S.; Ackermann, C.; Pharm. Research, **2004**, 21, 1192.

Netz, P. A.; George G. O.; Reologia in Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas ArtMed, ed., **2002**.

Okuno, E.; Caldas, I.L.; Chow, C. Física para Ciências Biológicas e Biomédicas. Harper & Row do Brasil, São Paulo, **1982**. 490 p.

Owen, D.; Peters, J. Katz, D.; Contraception **2000**, 62,321.

Pavelic, Z.; Skalko-Basnet, N.; Schubert, R.; Int. J. Pharm. **2001**, 219, 139.

Penzen, T; Csoka, I; Eros, I.; Rheol Acta, **2004**, 43, 457.

Prista, L. N.; Formas farmacêuticas obtidas por operações complexas ou múltiplas in Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 2, **1995**.

Ramirez, A.; Fresno, M. J.; Jiménez, M. M.; Selles, E.; Pharmazie **1999**, 54, 444.

Ribeiro, H. M. et al; Int. J. Cosmetic Science **2004**, 26, 47.

Schramm, G.A. Practical Approach to Rheology and Rheometry. 2nd, Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe Federal Republic of Germany, **2000**.

Shawesh, A. M.; Kaukonen, A. M.; Kallioinen, S.; Antikainen, O.; Yliruusi, J.; Pharmazie **2003**, 58, 130.

Tamura, T; Takayama, K.; Satoh, H.; Tanno, K.; Nagai, T.; Drug Dev. Ind. Pharm. **1997**, 23, 285.

Vennat, B.; Gross, D.; Pourrat, A.; Drug Dev. Ind. Pharm. **1992**, 18, 1535.

Vennat, B.; Gross, D.; Pourrat, A.; Pourrat, H.; Drug Dev. Ind. Pharm. **1991**, 17,

2083.

Welin-Berger, K.; Neelissen, J. A. M.; Bergenstahl, B.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 309.

Wilkinson, J.B.; Moore, R.J.; *Cosmetologia de Harry, Diaz de Santos, S.A.*: Madrid, **1990**.

Woolfson, A.D.; Malcolm, R.K.; Campbell, K.; Jones, D.S; Russell, J.A. J.; *Controlled Release*, **2000**, 67, 395.

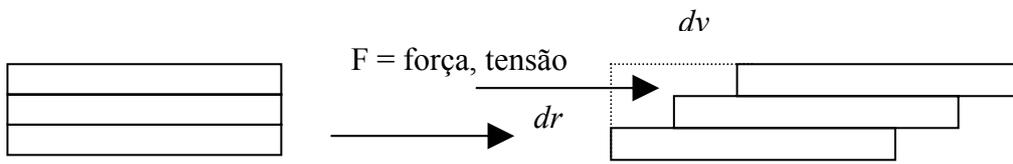


Figura 1. Representação de um material submetido à tensão de cisalhamento.

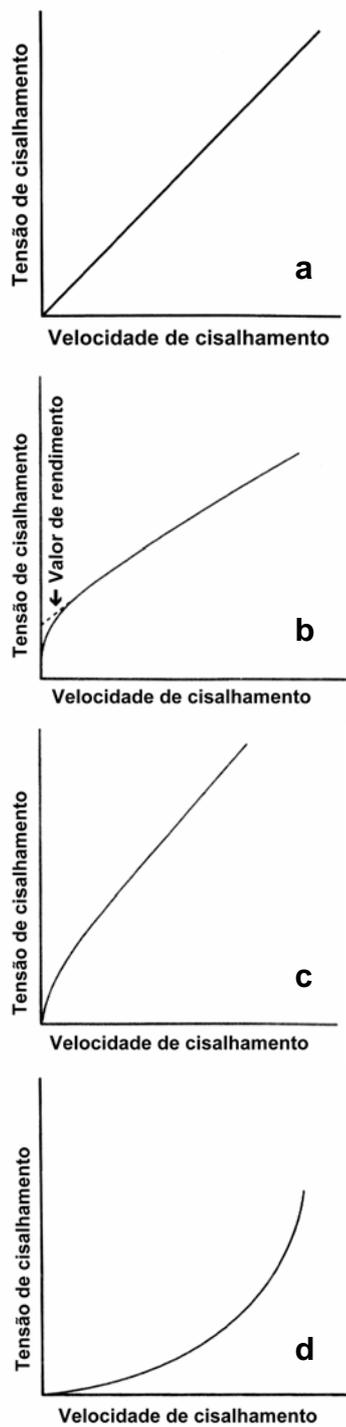


Figura 2. Comportamentos a) newtoniano, b) plástico, c) pseudo-plástico e d) dilatante.

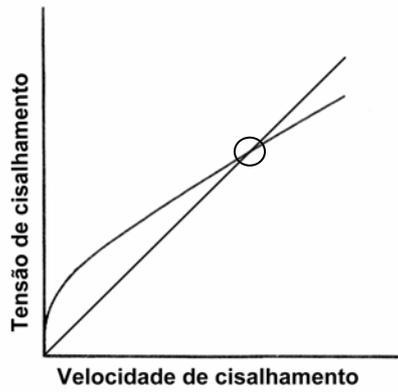


Figura 3. Reograma com duas formulações diferentes mostrando um ponto de convergência, onde a viscosidade aparente é igual para ambos os casos.

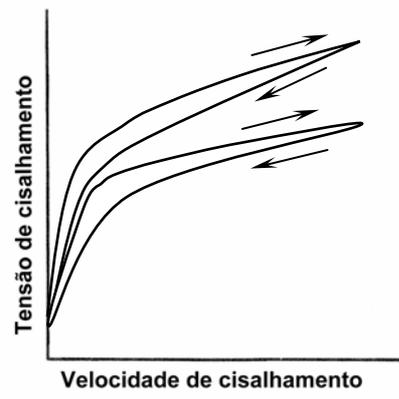


Figura 4. *Comportamento tixotrópico apresentado por formulações tópicas.*

PUBLICAÇÃO 2

***Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres
or nanoemulsion: development and rheological characterization***

Publicado no Periódico Die Pharmazie, v. 60, n.12, p. 63-67, 2005.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas¹, Departamento de Química Orgânica², Instituto de Química, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization

P. M. ALVES¹, A. R. POHLMANN², S. S. GUTERRES¹

Received April 27, 2005, accepted June 27, 2005

Prof. Dr. Silvia S. Guterres, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90 610-000 Porto Alegre, RS, Brasil
nanoc@farmacia.ufrgs.br

Pharmazie 60: 900–904 (2005)

The objective of this work was to develop and characterize semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanospheres, nanocapsules or nanoemulsion. The nanoprecipitation and spontaneous emulsification methods were used to prepare the colloidal suspensions and the nanoemulsion. The hydrodynamic diameters were 282 nm for the nanoemulsion, 293 nm for the nanocapsules and 191 nm for the nanospheres containing nimesulide. The encapsulation efficiencies were close to 99% in all cases and pH values ranged between 5.1 and 5.3. Each drug-loaded nanocarrier formulation was incorporated in Carbopol 940[®] gels. The semisolid dosage forms showed yellowish, glossy and homogeneous aspect after the incorporation of the colloidal suspensions and nanoemulsion. The recovery of nimesulide and the pH values for the gels containing nanoemulsion, nanospheres or nanocapsules remained constant during storage (120 days). For all formulations, the rheograms exhibited a non-Newtonian behavior presenting pseudoplastic characteristics and shear thinning. The rheograms were adjusted to Ostwald's model showing regression coefficients higher than 0.9900. None thixotropic phenomenon was experimentally detected under the test conditions for all formulations.

1. Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used in therapeutics due to their anti-inflammatory, analgesic or antipyretic activities. However, these drugs may also cause gastrointestinal disorders in some patients, including irritation, bleeding and ulceration (Babar et al. 1990; Curdy et al. 2001; Joseph et al. 2002). In consequence, there is a great interest in the development of topical dosage forms containing NSAIDs, in order to avoid gastrointestinal toxicity observed after oral administration or to promote significant levels of the drug in the application site for prolonged periods (Gürol et al. 1996; Mikulad et al. 1998). Nimesulide (4-nitro-2-phenoxymethanesulfonamide) differs from other NSAIDs by the chemical structure and selective inhibition of cyclooxygenase-2 (Kovariková et al. 2003). Several works were carried out with the objective of increasing the properties of dissolution and the bioavailability of nimesulide (Castelli et al. 2003; Meriani et al. 2003). Formulations were also developed including the drug in cyclodextrins (Nalluri et al. 2003), phospholipidic membranes (Ferreira et al. 2003) and in solid lipid nanoparticles (Patravale and Ambarkhane 2003). Comparing different NSAIDs, some studies have demonstrated that a gel containing nimesulide showed better anti-inflammatory activity than a gel loading diclofenac or piroxicam (Gupta et al. 1996). According to Sengupta et al.

(1998), the topical administration of nimesulide may be a safe and effective alternative to oral and rectal routes.

In the past few years, colloidal systems were prepared using biodegradable polymers that have been studied due to their potential for NSAID topical and ophthalmic administration (Couvreur et al. 1995; Yokoyama and Okano 1996; Giunchedi et al. 1999; Pinto-Aphandary et al. 2000; Kim and Lee 2001). These studies showed that the selectivity and efficiency of the drugs can be improved by encapsulating them in to the colloidal systems.

The main advantages of nanoparticles are the increasing of bioavailability in the case of poorly water-soluble drugs, the protection of drugs from inactivation in the gastro-intestinal tract, the protection of mucosa from the toxicity of drugs, the increasing of permeation of drugs through mucosal surfaces and the prolongation of the blood circulation of injected drugs (Legend et al. 1999). Besides, some investigations showed that nanoparticles and liposomes present the tendency to interact with inflamed tissues. This specificity may represent new possibilities of therapy for several rheumatic diseases (Kreuter 1994) by using the encapsulation of NSAIDs or antibiotics in nanocarrier systems as a strategy.

The literature shows that the efficiency and the adjustment of the cutaneous route may open a therapeutical alternative for NSAID administration (Bernareggi 1988; Foldvari 2000; Güngör and Bergisadi 2003). The objective

of this work was to develop and characterize semisolid topical formulations containing nimesulide encapsulated in nanospheres, nanocapsules and nanoemulsion. Up to now, as far we know, there is no report in the literature which proposes the entrapment of nimesulide in nanoparticles, which are dispersed in gel formulations.

2. Investigations, results and discussion

The nanocapsules, nanospheres, and the nanoemulsion containing nimesulide were obtained as aqueous colloidal formulations. The physicochemical characteristics of the nimesulide-loaded nanocarriers are presented in Table 1. The particle sizes were in the sub 300 nm range. These results are compatible with those reported for similar systems containing diclofenac, another NSAIDs (Guterres et al. 1995; Müller et al. 2001; Milão et al. 2003). The encapsulation efficiencies were close to 99% for all formulations and the pH values were in the range of 5.1 to 5.3. The formulations did not present significant difference ($p > 0.05$) among the pH values.

The nimesulide-loaded nanoemulsion (1.37 mg/ml), nanocapsules (1.41 mg/ml), and nanospheres (1.37 mg/ml), recently prepared, were incorporated in Carbopol 940[®] gel. This acrylic acid hydrogel has been selected due to its widely use in pharmaceutical formulations (Peppas et al. 2000). The nimesulide concentrations in the gels were limited to its concentration in each nanocarrier formulation, which was used as aqueous phase in each gel product. In this way, gels presented final nimesulide concentrations of 1.30 mg/g (nanoemulsion: GNM-NE), 1.29 mg/g (nanocapsules: GNM-NC) and 1.26 mg/g (nanospheres: GNM-NS). A similar gel (GC-NM) formulation containing 1.5 mg/g of nimesulide but using water instead of a nano-

Table 1: Parameters of nanoemulsion, nanospheres and nanocapsules characterization (mean \pm SD, n = 3)

Formulation	Particle size (nm \pm s)	pH (\pm s)	Entrapped drug (mg/mL)	Encapsulation efficiency (%)
NE	282 \pm 22	5.3 \pm 0.05	1.37 \pm 0.05	98.9 \pm 0.4
NC	293 \pm 9	5.2 \pm 0.34	1.41 \pm 0.10	99.2 \pm 0.4
NS	191 \pm 14	5.1 \pm 0.13	1.37 \pm 0.05	99.3 \pm 0.2

NE, nimesulide-loaded nanoemulsion; NC, nimesulide-loaded nanocapsule suspensions; NS, nimesulide-loaded nanosphere suspensions

Table 2: Composition of gel formulations

Components	Formulations				
	GNM-NE	GNM-NC	GNM-NS	GC-NM	GC
Carbopol 940 [®]	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Methylparaben	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Propylparaben	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Sorbitol	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Triethanolamine	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Nimesulide	—	—	—	0.15 g	—
Sorbitan monoostearate	—	—	—	0.76 g	—
Polysorbate 80	—	—	—	0.76 g	—
Nimesulide-loaded Nanoemulsion	ad 100 g	—	—	—	—
Nimesulide-loaded Nanocapsules	—	ad 100 g	—	—	—
Nimesulide-loaded Nanospheres	—	—	ad 100 g	—	—
Distilled water	—	—	—	ad 100 g	ad 100 g

Table 3: Nimesulide contents (%) and values of pH in the gels as function of time (mean \pm SD) (n = 3)

Formulations	Nimesulide (%)		pH	
	Initial ^(*)	4 months	Initial ^(*)	4 months
GNM-NE	102.9 \pm 4.3	106.1 \pm 5.5	6.82 \pm 0.26	6.51 \pm 0.12
GNM-NC	98.3 \pm 6.0	105.6 \pm 10.4	6.84 \pm 0.07	6.53 \pm 0.30
GNM-NS	97.7 \pm 3.8	107.5 \pm 8.8	6.98 \pm 0.05	6.70 \pm 0.27
GC	—	—	7.01 \pm 0.11	7.02 \pm 0.12
GC-NM	97.7 \pm 2.2	99.94 \pm 4.7	6.89 \pm 0.11	6.87 \pm 0.09

GNM-NE, gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion; GNM-NC, gel containing nimesulide-loaded nanocapsule; GNM-NS, gel containing nimesulide-loaded nanosphere; GC gel control; GC-NM, gel containing nimesulide

* 48 h after preparation

carrier formulation was also prepared for comparison. In parallel, a gel (GC) with neither nimesulide nor nanocarriers was also prepared as control (Table 2).

All the gel formulations showed satisfactory organoleptic characteristics after the incorporation of nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion containing nimesulide. When pure nimesulide was incorporated, the gel showed a yellowish color. On the other hand, when nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion were incorporated, the gels were white.

Table 3 shows the contents of nimesulide in gels with nanoemulsion (GNM-NE), nanocapsules (GNM-NC), nanospheres (GNM-NS) and gel with nimesulide (GC-NM) after preparation and after 4 months of storage at room temperature. The formulations were stable during storage, presenting no significant decrease of nimesulide contents ($p > 0.05$) by the F-test. Regarding the pH, all gel formulations presented values close to 7, which were stable after 4 months ($p > 0.05$).

Through the analysis of the rheograms (Gupta and Garg 2002) in Fig. 1, it is possible to verify that the flow curves of all gels showed non-Newtonian behavior, since their viscosities were not constant (Radebaugh et al. 1996; Shawsheh et al. 2003). The non-Newtonian behavior of this kind of preparation is reflected by the Power Law index (n) (Contreras et al. 2001).

There are several models, which may be used to establish index flow (n) in different non-Newtonian systems (Kim et al. 2003). The most adequate model for a viscoplastic fluid depends on the fluid response to deformation and how well the experimental data fit the model (Briceño 2000). The formulations were analyzed using different models: Bingham (Eq. (1)), Casson (Eq. (2)), Ostwald (Eq. (3)) and Herschel-Bulkley (Eq. (4)).

$$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5} \dot{\gamma}^{0.5} \quad (2)$$

$$\tau = \kappa \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

$$\tau = \tau_0 + \kappa \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

The τ_0 is the yield stress, η is the viscosity, n is the index of flow, K is the index of consistency, τ is the shear stress and $\dot{\gamma}$ is the shear rate (Kim et al. 2003).

The rheograms of this study were better adjusted to the Ostwald's model. The results showed good regression coefficients, proving that the Potency Law reproduced properly the rheological behavior of these systems (Table 4). The gels showed pseudoplastic and shear thinning behavior ($n < 1$) (Table 5). The consistency index (κ) and the flow index (n) were compared between each gel containing nanocarrier formulation (GNM-NE, GNM-NC or

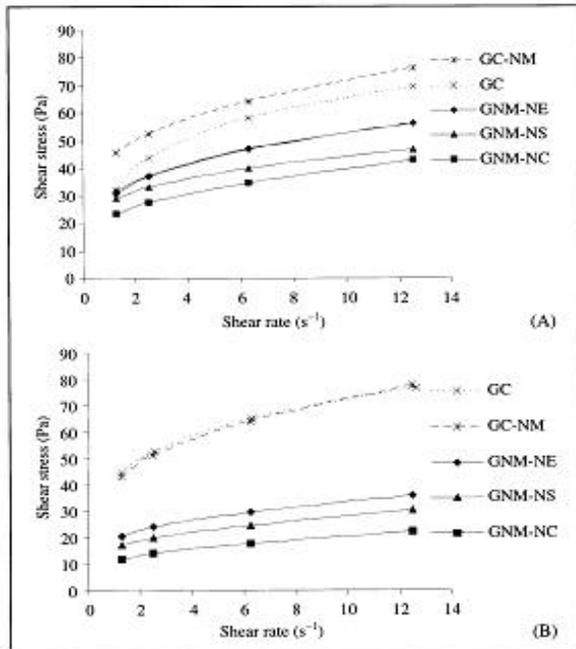


Fig. 1: Rheograms of GNM-NE (gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion); GNM-NC (gel containing nimesulide-loaded nanocapsule); GNM-NS (gel containing nimesulide-loaded nanosphere); GC-NM (gel containing nimesulide) and GC (gel control). (A) shear stress vs. shear rate, 7 days after preparation; (B) shear stress vs. shear rate, 4 months after preparation

Table 4: Regression coefficient (R²) for various flow models in shear rate-shear stress curve

Formulations	Bingham	Casson	Ostwald	Herschel-Bulkley
GNM-NE	0.9720	0.9932	0.9959	0.9406
GNM-NC	0.9716	0.9974	0.9958	0.9409
GNM-NS	0.9745	0.9981	0.9941	0.9421
GC	0.9359	0.9842	0.9995	0.8395
GC-NM	0.9582	0.9884	0.9958	0.9119

GNM-NE, gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion; GNM-NC, gel containing nimesulide-loaded nanocapsule; GNM-NS, gel containing nimesulide-loaded nanosphere; GC gel control; GC-NM, gel containing nimesulide

GNM-NS), the nimesulide-loaded gel (GC-NM) and the control gel (GC) (Table 5) after preparation and after 4 months of storage at room temperature. No thixotropic phenomenon was experimentally detected under the test conditions for all formulations. It is important to consider

that the validity of this model is limited to the region of the tested deformation conditions.

The results (Figs. 1A, 1B and Table 5) show that the incorporation of the nanocarrier formulations did not modify the kind of flow presented by these systems neither for the initial values nor after the storage period. Considering these results it is possible to conclude that all formulations showed adequate characteristics to be topically applied. In the case of dermatological administration, plastic properties are preferred because the formulation flow resistance is low when it is applied under medium to high shear conditions. On the other hand, the flow is zero under stress caused by gravity (Welin-Berger et al. 2001). Thus, plasticity presents an obvious relevance as a suitable descriptor of the consistency of topical formulations and the viscosity has a dominant effect on the release of the active substance from the vehicle (Welin-Berger et al. 2001). According to the initial values (Table 5), there was no significant difference ($p > 0.05$) between the gel formulations containing nanoemulsion (GNM-NE) or nanocapsules (GNM-NC) in relation to the gel control (GC) concerning the flow index (n). The gel formulations containing nimesulide-loaded nanospheres (GNM-NS) and nimesulide (GC-NM) showed significant difference ($p > 0.05$) in the flow index compared to the gel control (GC) according to Tukey's test. After 4 months there was no significant difference in the flow index (n) among all the formulations tested. It should be noted that the gel control (GC) showed an alteration in the flow index after the storage period. This alteration can be explained by the increase of the consistency (Table 5) of the gel control (GC) and the possible rearrangement of the polymeric network during the storage period. The structure of Carbopol[®] gels is determined by the level in which the macromolecules connect and form entanglement networks (Contreras et al. 2001). In accordance with the initial results, there was not significant difference ($p > 0.05$) in the consistency index (K) of the gels containing the nanocarrier formulations (GNM-NE, GNM-NC, GNM-NS) compared to the gel control (GC). The gel containing nimesulide (GC-NM) showed a consistency index (κ) different from the gel control (Table 5). After the storage period there was a significant decrease in the consistency index (K) of the gels containing nanocarriers (GNM-NE, GNM-NC, GNM-NS) compared to the gel control (Fig. 1B and Table 5). The decrease in viscosity for semisolid formulations containing nanocarriers has been previously reported in the literature when liposomes containing calcine were added in Carbopol[®] gel (Pavelic et al. 2001). Similar results about the viscosity of hydrogels based on Carbopol[®] were also observed after the methyl- β -cyclodextrin incorporation (Booulmedarat et al. 2003).

Table 5: Flow indexes (n), consistency (K) and spreadability (S_i) of the gels

Formulations	n		$K(\text{Pa} \cdot \text{s}^n)$		$S_i (\text{mm}^2)$	
	Initial*	4 months	Initial*	4 months	Initial*	4 months
GNM-NE	0.25 ^{ab}	0.24 ^b	29.79 ^a	19.40 ^b	2708.2 ^a	3119.3 ^{abc}
GNM-NC	0.26 ^{ab}	0.26 ^b	21.97 ^a	11.17 ^b	2771.0 ^a	3172.1 ^{ab}
GNM-NS	0.20 ^b	0.24 ^b	27.77 ^a	16.08 ^b	2534.2 ^a	3276.44 ^a
GC	0.33 ^a	0.23 ^b	30.77 ^a	42.25 ^a	2649.2 ^a	2530.6 ^{bcd}
GC-NM	0.22 ^b	0.25 ^b	43.25 ^b	40.80 ^a	2591.9 ^a	2226.5 ^d

GNM-NE, gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion; GNM-NC, gel containing nimesulide-loaded nanocapsule; GNM-NS, gel containing nimesulide-loaded nanosphere; GC gel control; GC-NM, gel containing nimesulide

* 7 days after preparation

a-b-e-d: the averages with different letters (inside of the same column) were considered statistically different in agreement with Tukey's test

The efficacy of a topical therapy depends on the way in which the patient spreads the drug formulation in even layers to administer a standard dose. Spreadability is therefore an important characteristic of these formulations and it is responsible for correct dosage transfer to the target site (Garg et al. 2002). Many authors have evaluated the applicability of products using the theoretical equation of laminar flow "plan between parallel plates" (Vennat et al. 1992; Lardy et al. 2000). The parallel plates method is the most used to regulate and quantify the applicability of semisolid preparations (Garg et al. 2002). The results concerning the spreadability of gels are showed in Figs. 2A and B. After preparation (7 days), it was not detected significant differences of spreadability ($p > 0.05$) between each formulation containing nanocarriers (GNM-NE, GNM-NC, GNM-NS) and the gel control (GC) (Fig. 2A). After 4 months of storage the gels GNM-NE, GNM-NC and GNM-NS did not show significant difference ($p > 0.05$) of spreadability among their values. On the other hand, the gel containing nimesulide-loaded nanospheres (GNM-NS) showed significant increase of spreadability in relation to the control (GC) according to Tukey's test (Fig. 2B). The correspondent graphic representations of spreadability showed similar profiles for all formulations. Furthermore, these results are in agreement with those presented by the rheograms. The structure of Carbopol[®] (network extent) has implications on the facility in which the initial deformation occurs and in the flow index proper for each formulation. It is important to take into account the decrease of gel viscosity observed by the consistency (Table 5) after the incorporation of this type of nanocarrier system.

In conclusion, this work showed that different nimesulide-loaded nanocarriers (nanoemulsion, nanocapsules, nanospheres) can be incorporated in semisolid hydrophilic gels. In general, the incorporation of nanoemulsion, nanocap-

sules or nanospheres did not affect the non-Newtonian behavior and the pseudoplastic character of the gels. These gels presented adequate physico-chemical properties for the topical administration of nimesulide.

3. Experimental

3.1. Materials

Nimesulide was obtained from Henrifarma and poly(ϵ -caprolactone) (PCL, MW = 80,000) from Aldrich (Strasbourg, France). Caprylic/capric triglyceride; sorbitan monostearate; polysorbate 80; methylparaben, propylparaben, sorbitol and triethanolamine were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Carbopol 940[®] was acquired from B. F. Goodrich, São Paulo, Brazil. All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

3.2. Preparation of formulations

Nanocapsules suspensions of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) containing nimesulide were prepared by nanoprecipitation (Fessi et al. 1988) and spontaneous emulsification. Briefly, the lipophilic solution was consisted of triglyceride (3.1 mL), nimesulide (0.150 g), sorbitan monostearate (0.766 g), the polymer (1.000 g) and acetone (267.0 mL). Nanosphere suspensions were prepared without the addition of the oil. Nanoemulsion was prepared without the addition of the PCL. This organic phase was added under moderate magnetic stirring into an aqueous solution containing polysorbate 80 (0.766 g in 533.0 mL of water). Acetone was removed and water was concentrated by evaporation under reduced pressure and the final formulation was adjusted to 100 mL. Formulations were made in triplicate.

The particle sizes were measured by laser light scattering (Brookhaven Instruments BI-200M, Spectra Physics He-Ne, $\lambda_0 = 632.8$ nm).

Nimesulide was assayed by HPLC. The system consisted of a SPD-10A Shimadzu detector, LC-10AD Shimadzu pump, SIL-10A Shimadzu injector and Lichrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m) column. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (60:40 v/v). Nimesulide was detected at 230 nm with a retention time of about 5.3 min. Free nimesulide (non-associated with nanocarriers) was determined in the ultrafiltrate after separation of the continuous phase from nanoemulsions, nanocapsules or nanospheres by ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC 10.000 MW, Millipore). Total nimesulide was measured by HPLC after dissolution of all components of the formulations by acetonitrile. The associated nimesulide with the nanocarriers (nanoemulsions, nanocapsules and nanospheres) was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations. The pH values of the formulations were determined directly in the samples (Micronal B374 potentiometer).

3.3. Gel preparation

The weight amounts of the gel constituents (Table 2) were placed in a beaker. Stirring was continued until all ingredients were completely dispersed/dissolved. All formulations were prepared in triplicate.

3.4. Gel characterization

3.4.1. Viscosity

The rheological study of the gels was carried out at 23 ± 1 °C using a Brookfield rotational viscometer, mode LVF, spindle n° 4, with a shear rate interval from 6 to 60 rpm. The data were analyzed by using conventional flow equations such as Bingham, Casson, Ostwald and Herschel-Bulkley. The data obtained were analyzed with Excel for Windows software.

3.4.2. pH Determination

The pH values of the gels were determined directly in the samples (Micronal B374 potentiometer).

3.4.3. Determination of nimesulide in the gels

The content of nimesulide in the gels was determined by HPLC after the following extraction procedure. Approximately 1.0 g of each formulation was accurately weighed and placed in a 50 mL volumetric flask. Acetonitrile was added and the flask was heated to 65 °C until the gel was completely dissolved. The solution was cooled to room temperature and properly diluted with acetonitrile. After filtration through a 0.22 μ m hydrophilic membrane (Durepore[®]), the solutions were injected into the chromatograph under the conditions described above (see characterization of formulations).

3.4.4. Spreading capacity

After preparation (7 days) and after 4 months of storage, the gels were pressed between sequences of weights (g) 49.4, 98.8, 148.0, 197.6, 250.3,

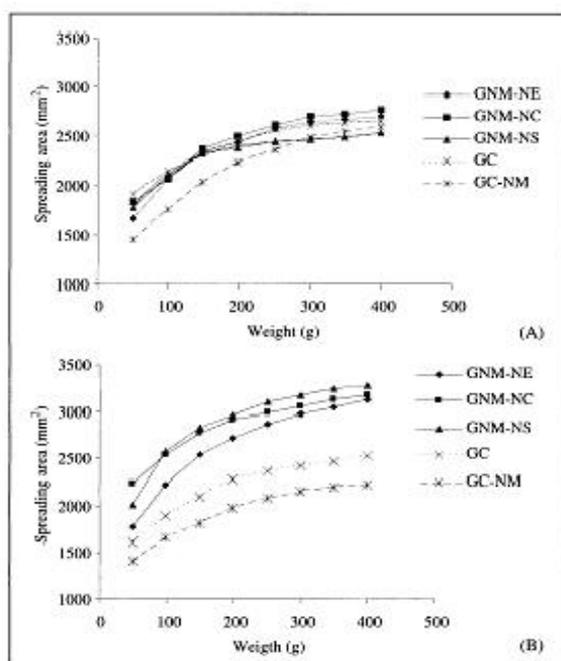


Fig. 2: Spreadability of the gels (A) after 7 days; (B) after 4 months

299.8, 348.6, 400.8 respectively, for one minute each, with intervals of 30 s between weights. The spreading areas reached by samples were measured in millimeters in vertical and the horizontal axes. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation (Eq. (5)) (Münzel et al. 1959; De Paula et al. 1998):

$$S_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad (5)$$

in which S_i is the spreading area (mm) resulting from the applied mass i (g), and d is the mean diameter (mm) reached by each sample. The spreading area was plotted against the plate weights to obtain the spreading profiles.

3.4.5. Stability

The gels were packed in opaque vessels and stored at room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). For each formulation, the parameters previously described were checked at regular time intervals (after preparation and after 4 months of storage). Physical stability evaluation of the samples was carried out by visual inspection, rheological tests and spreadability. Chemical stability was evaluated by pH and HPLC analyses.

3.5. Statistics

All the results are expressed as the mean \pm the standard deviation of the mean and statistically analyzed using variance analysis (ANOVA). Results presenting $p < 0.05$ were considered statistically different. The comparisons among the averages were performed using Tukey's test.

Acknowledgements: The authors thank FAPERGS, CNPq/Brasília and Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT.

References

- Babar A, Solanki UD, Cutie AJ, Plakogiannis F (1990) Piroxicam release from dermatological bases: in-vitro studies using cellulose membrane and hairless mouse skin. *Drug Dev Ind Pharm* 16: 523–540.
- Bernareggi A (1988) Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin Pharmacokinet* 35: 247–274.
- Booulmedarat L, Grossiord JL, Fattal E, Bochot A (2003) Influence of methyl- β -cyclodextrin and liposomes on rheological properties of Carbopol 974[®] NF gels. *Int J Pharm* 254: 59–64.
- Briecño MI (2000) Rheology of suspensions and emulsions In: Nielloud F, Marti-Mestres G (ed.) *Pharmaceutical Emulsion and Suspensions*, New York, p. 557–608.
- Castelli F, Sarpietro GM, Messina C, Lazzari A, Rosa D, Giannetto A (2003) Differential scanning calorimetry differences in micronized and unmicronized nimesulide uptake processes in biomembrane models. *Eur J Pharm Sci* 19: 237–243.
- Contreras MJF, Diéguez AR, Soriano MMJ (2001) Rheological characterization of hydroalcoholic gels – 15% ethanol – of Carbopol[®] Ultrez 10. *Fármaco* 56: 437–441.
- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm* 41: 2–13.
- Curdy C, Kalia YN, Naik A, Guy RH (2001) Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. *J Controlled Release* 76: 73–79.
- De Paula IC, Ortega GG, Bassani VL, Petrovick PR (1998) Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline saturoioides* spray-dried extracts. *Drug Dev Ind Pharm* 24: 235–241.
- Ferreira H, Lucio M, De Castro B, Gameiro P, Lima RS (2003) Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *Anal Bioanal Chem* 377: 293–298.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J (1988) Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *EP 0274961 A1*.
- Foldvari M (2000) Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm Sci Technol Today* 3: 417–425.
- Garg A, Aggarwal D, Garg S, Singla A (2002) Spreading of semisolid formulations *pharm technol* 26: 84–105.
- Giunchedi P, Conte U, Chetoni P, Saettoni MF (1999) Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam: evaluation *in vitro* and *in vivo* in albino rabbits. *Eur J Pharm Sci* 9: 1–7.
- Güngör S, Bergisadi N (2003) *In vitro* release studies on topical gel formulations of nimesulide. *Pharmazie* 58: 155–156
- Gupta P, Garg S (2002) Recent advances in semisolid dosage forms for dermatological application. *Pharm Technol* 26: 144–162.
- Gupta SK, Prakash J, Awor L, Joshi S, Velpandian T, Sengupta S (1996) Anti-inflammatory activity of topical nimesulide gel in various experimental models *Inflammation Res* 45: 590–592.
- Gürol Z, Hekimoglu S, Demirdamar R, Sumnu M (1996) Percutaneous absorption of ketoprofen I. In vitro release and percutaneous absorption of ketoprofen from different ointment bases. *Pharmazie Acta Helv* 71: 205–212.
- Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Puisieux F, Devissaguet J-Ph (1995) Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int J Pharm* 113: 57–63, 1995.
- Joseph NJ, Lakshmi S, Jayakrishnan A (2002) A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: *in vitro* and *in vivo* evaluation in rabbits. *J Control Release* 79: 71–79.
- Kim J, Song J, Lee E, Park S (2003) Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Sci* 281: 614–623.
- Kim SY, Lee MY (2001) Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly (ethylene glycol) and poly (ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* 22: 1697–1704.
- Kovarková P, Mokry M, Klimes J (2003) Photochemical stability of nimesulide. *J Pharm Biomed Anal* 31: 827–832.
- Kreuter J (1994) Colloidal drug delivery systems. In: Kreuter J (ed) *Nanoparticles*, New York, p. 314.
- Lardy F, Vennat B, Pouget MP, Pourrat A (2000) Functionalization of hydrocolloids: principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 715–721.
- Legrand P, Barrat G, Mosqueira V, Fessi H, Devissaguet JP (1999) Polymeric nanocapsules as drug delivery system A review. *S.T.P. Pharma Sci* 9: 411–418.
- Meriani F, Coceani N, Sirotti C, Voinovich D, Grassi MJ (2003) Characterization of a quaternary liquid system improving the bioavailability of poorly water soluble drugs. *Colloid Interface Sci* 263: 590–596.
- Mikulac SA, Vangness CT, Mimmi MEJ (1998) Transdermal delivery and accumulation of indomethacin in subcutaneous tissues in rats. *J Pharm Pharmacol* 50: 153–158.
- Milao D, Knorst MT, Guterres SS (2003) Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. *Pharmazie* 58: 325–329.
- Muller CR, Schaffazick SR, Pohlmann AR, de Lucca Freitas L, Pesce da Silveira N, Dalla Costa T, Guterres SS (2001) Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie* 56: 864–867.
- Münzel K, Büechi J, Schulz OE, Büechi J (1959) *Galenisches Praktikum, Wissenschaftliche Verl.-Ges., Stuttgart*.
- Nalluri BN, Chowday KP, Murthy KV, Hayman AR, Becker (2003) Physicochemical characterization and dissolution properties of nimesulide-cyclodextrin binary systems. *AAPS PharmSciTech* 4: article 2
- Patravale VB, Ambarkhane AV (2003) Study of solid lipid nanoparticles with respect to particle size distribution and drug loading. *Pharmazie* 58: 392–395.
- Pavelic Z, Skalko-Basnet N, Schubert R (2001) Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm* 219: 139–149.
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 27–46.
- Pinto-Alphandary H, Andrement A, Couvreur P (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents* 13: 155–188.
- Radebaugh GW (1996) Rheological and Mechanical Properties of Dispersed Systems in Lieberman JA, Rieger MM, Banker GS (ed) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, 2nd ed., New York, v. 1, p. 153–209.
- Sengupta S, Velpandian T, Kabir SR, Gupta SK (1998) Analgesic efficacy and pharmacokinetics of topical nimesulide gel in healthy human volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac and placebo. *Eur J Clinical Pharm* 54: 541–547.
- Shawesh AM, Kaukonen AM, Kallioinen S, Antikainen O, Yliruusi J (2003) Development of indomethacin Carbopol ETD 2001 gels and the influence of storage time and temperature on their stability. *Pharmazie* 58: 130–135.
- Vennat B, Gross D, Pourrat A (1992) Procyanidin Gels Based on cellulose and Carragenan Derivatives. *Drug Dev Ind Pharm* 18: 1535–1548.
- Welin-Berger K, Neelissen JAM, Bergenstahl B (2001) The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur J Pharm Sci* 13: 309–318.
- Yokoyama M, Okano T (1996) Targetable drug carriers: present status and a future perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 21: 77–80.

***CAPÍTULO 2 – Estudos de absorção percutânea em formas farmacêuticas plásticas
contendo nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas de nimesulida***

INTRODUÇÃO

Atualmente existe um grande interesse no desenvolvimento de formulações tópicas contendo AINES, as quais são capazes de liberar o fármaco no sítio de ação, ou seja, no local inflamado, minimizando efeitos sistêmicos adversos, devido a sua baixa concentração plasmática (Rovensky *et al.*, 2003). Estas formulações incluem cremes, géis e sistemas transdérmicos mais complexos, empregando uma gama de fármacos desta classe terapêutica.

Existem muitos estudos sendo realizados, utilizando esta via para administração de fármacos de ação antiinflamatória (Singh e Roberts, 1994; Santoyo *et al.*, 1995; Gürol *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995; Yokomizo e Sagitani, 1996; Pellet *et al.*, 1997a; Pellet *et al.*, 1997b; Dhaon *et al.*, 1998; Goosen *et al.*, 1998; Jager *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1999, Beetge *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2000; Bonina *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001; Curdy *et al.*, 2001).

Esta abordagem evita o efeito de primeira-passage hepática que é a responsável pelas perturbações gastrintestinais, as quais podem ocorrer pela administração oral. Considerando que os AINES são geralmente administrados por um período prolongado, é desejável que as reações adversas sejam reduzidas (Santoyo *et al.*, 1995; Goosen *et al.*, 1998).

No caso de AINES, o ideal seria alcançar a dosagem terapêutica do fármaco no tecido designado, mantendo a concentração gastrintestinal tão baixa quanto possível. Obviamente, tal meta só poderá ser alcançada se a substância for administrada por outra via de administração diferente da oral. Por estas razões, injeções tópicas ou aplicações epicutâneas com formulações especiais de diclofenaco foram desenvolvidas e comercializadas. O produto mais conhecido é o Voltaren Emulgel®, especialmente desenvolvido para a administração tópica, embora a profundidade de penetração do diclofenaco a partir do emulgel seja somente de 3-4 mm (Cevc *et al.*, 2001).

Dados previamente descritos por Cordero e colaboradores (1997) afirmam que a baixa penetração através do transporte passivo do piroxicam, outro AINE, reflete a pequena capacidade de permeação intrínseca desta substância. Para aumentar o transporte de piroxicam, através da pele, Pellet e colaboradores (1997b) investigaram

soluções supersaturadas deste fármaco, tendo observado um aumento do fluxo frente a soluções saturadas.

Gupta e colaboradores (1996) testaram a atividade antiinflamatória de gel contendo nimesulida aplicado topicamente. Foram empregados diferentes modelos experimentais em animais para a comparação de géis contendo diclofenaco ou piroxicam e os resultados demonstraram que o gel de nimesulida possui uma atividade antiinflamatória mais alta do que os géis de diclofenaco e piroxicam.

Estudos farmacocinéticos de tolerância e eficácia em animais e humanos foram realizados com formulações de gel contendo nimesulida. Concentrações plasmáticas muito baixas de nimesulida foram observadas após aplicação tópica, indicando uma limitada exposição sistêmica do fármaco. A nimesulida foi detectada no plasma de 6 indivíduos de um total de 18, entre 1,5 e 24 horas após a aplicação. A concentração plasmática mais elevada (10 µg/ml) foi observada em apenas 1 indivíduo nas 24 horas após a administração tópica (Bernareggi, 1998).

Sengupta e colaboradores (1998) conduziram estudos em humanos, comparando a eficácia analgésica de formulações tópicas de nimesulida, diclofenaco, piroxicam e placebo, em 3 grupos paralelos. A atividade analgésica superior apresentada pela nimesulida, foi correlacionada com o seu perfil farmacocinético, indicando que a via tópica para a administração do fármaco, pode ser uma alternativa segura e efetiva à via oral e retal usadas atualmente.

Um outro estudo foi realizado para determinar a eficácia, tolerância e aceitabilidade de formulações tópicas em gel contendo nimesulida (1 %), diclofenaco (1 %) e piroxicam (0,5 %). Este estudo foi planejado visando à expectativa de limitar a irritação gástrica pelo uso alternativo de formulações tópicas. Foi realizada uma avaliação comparativa entre os géis, sendo analisados 276 pacientes com danos musculoesqueléticos, envolvendo sintomas de dor e inflamação. Os autores concluíram que a eficácia e tolerabilidade do tratamento com gel de nimesulida, foi superior ao gel com diclofenaco e piroxicam. Desta forma, o gel transdérmico contendo nimesulida, foi considerado o mais útil e tolerável, na gama de tratamentos estabelecidos para danos musculoesqueléticos agudos (Dhaon *et al.*, 2000).

Kanikkannan e colaboradores (2001) estudaram o potencial de sensibilização da nimesulida na pele, concluindo que nas condições testadas o fármaco não apresentou poder de sensibilização.

O veículo no qual a substância ativa é incorporada deve promover não somente a solubilização necessária, mas um maior contato entre o ativo e a pele (Alvarez-Roman *et al.*, 2001). A encapsulação de fármacos em sistemas nanoparticulados é uma estratégia crescentemente implementada para vetorização de ativos. Jennings e colaboradores (2000a) destacam ainda, o pequeno tamanho das nanopartículas, as quais apresentam elevada área superficial, facilitando o contato dos fármacos encapsulados com o estrato córneo e, conseqüentemente, a quantidade de ativo capaz de penetrar na pele viável (Maia *et al.*, 2000).

Em função da aplicação de nanopartículas na pele ser um tema de investigação bastante recente, foi elaborado na presente tese um artigo com objetivo de abordar aspectos relativos ao uso de preparações farmacêuticas e cosméticas contendo estes sistemas. Esta revisão descreve ainda, possíveis mecanismos de absorção, penetração ou interação com a pele e mucosas. Este artigo será submetido à publicação e encontra-se descrito na publicação 3, deste capítulo.

Cada formulação, juntamente com a substância veiculada, apresenta um mecanismo de ação de acordo com as interações físico-químicas apresentadas no sistema e/ou com a membrana biológica. Desta forma, é de fundamental importância que estas interações sejam analisadas e descritas, através de experimentos *in vitro* para os diferentes produtos utilizados.

A interação dos constituintes de uma formulação tópica com a pele é um dos fatores mais importantes para efetiva liberação do veículo. O efeito pode ser aumentado por alterações na formulação, prevendo-se desta forma, uma provável penetração dos solutos (Cross *et al.*, 2001). A absorção percutânea é um complexo processo biológico e físico-químico e muitos modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar ou prever a liberação e penetração transdérmica de fármacos em animais e humanos (Singhi e Roberts, 1994; Santoyo *et al.*, 1995; Cornwell *et al.*, 1995; Hadgraft *et al.*, 1996; Yokomizo *et al.*, 1996; Pellet *et al.*, 1997b; Jager *et al.*, 1999; Venter *et al.*, 2001; Puglia *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2001).

De acordo com o que foi referido anteriormente, o objetivo da publicação 4 (em redação) foi avaliar a penetração percutânea *in vitro* através de pele humana, da nimesulida veiculada a formulações semi-sólidas tópicas contendo nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsões.

PUBLICAÇÃO 3

Nanopartículas, Nanocápsulas e Nanoemulsões para Aplicação Tópica de Produtos

Farmacêuticos e Cosméticos

Artigo a ser submetido ao periódico Drug Target Insights

*Nanopartículas, Nanocápsulas e Nanoemulsões para Aplicação
Tópica de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos*

Marta P. Alves¹, Adriana. Pohlmann² & Sílvia S. Guterres^{1*}

¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

² *Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, CP 15003, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

* *Autor a quem a correspondência deverá ser enviada. E-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br*

SUMMARY

This article presents an overview about the use of the pharmaceutical and cosmetic topical products containing nanoparticles, nanocapsules or nanoemulsion, describing the possible absorption mechanisms, penetration or interactions with the skin and the mucous membranes. These systems containing nanocarriers can modify the activity of the drug through alterations in the physic-chemical properties, delaying and sustained release the drugs, as well as, to increase the adhesiveness or the time of permanence in the skin. These systems represent yet an important resource for the topical formulation of drugs with little solubility or instability in aqueous medium.

KEY WORDS: nanoparticles, nanocapsules, nanoemulsion, topical formulation.

RESUMO

Este artigo apresenta uma revisão sobre os aspectos relativos ao uso de preparações farmacêuticas e cosméticas contendo nanopartículas, nanocápsulas e nanoemulsões aplicadas topicamente, descrevendo os possíveis mecanismos de absorção, penetração ou interações com tecidos epiteliais como a pele e as mucosas. De acordo com os dados analisados, verifica-se que estes sistemas podem modificar a atividade do fármaco através de alterações nas propriedades físico-químicas, retardar e controlar a liberação do ativo, bem como, aumentar a adesividade ou o tempo de permanência na pele. Estes sistemas representam ainda, um recurso importante para os ativos que possuem pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso.

PALAVRAS-CHAVE: nanopartículas, nanocápsulas, nanoemulsões, formulações tópicas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia mais promissora para aumentar e controlar a penetração de fármacos através da pele. Microemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas têm sido investigadas como opções frente ao uso dos sistemas mais clássicos, tais como os promotores químicos de penetração. Neste sentido, a escolha criteriosa dos materiais poliméricos para encapsulação de fármacos e ativos cosméticos é uma alternativa empregada para modificar as propriedades físico-químicas da substância encapsulada e oferecer meios para facilitar a penetração percutânea ¹.

Atualmente existe um interesse amplo na liberação seletiva de fármacos, em vista disso, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com o objetivo de melhorar a seletividade e eficiência das formulações. Os sistemas de liberação controlada e/ou sustentada são uma resposta a esta tendência, uma vez que são planejados para proporcionar níveis adequados do fármaco ou ativo cosmético no local de interesse, por períodos prolongados, favorecendo o tratamento ².

Pode-se definir substância vetorizada como aquela que é liberada seletivamente em sítios fisiológicos específicos, órgãos, tecidos ou células, onde a atividade farmacológica ou efeito cosmético são requeridos ^{3,4}. Uma liberação sustentada do fármaco poderá suprir a pele por um período de tempo mais prolongado. Pode-se considerar, ainda que, a especificidade dos sistemas vetorizados, propicia um tratamento diretamente no local da inflamação, apresentando a possibilidade de reduzir absorção sistêmica e os efeitos colaterais em sítios não específicos, proporcionando índices terapêuticos mais adequados ^{3,5}. Os sistemas carreadores nanoestruturados têm sido extensivamente estudados para administração oral e parenteral, podendo também serem utilizados para liberação de várias substâncias através da pele ⁶.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetros inferiores a 1 µm e diferem entre si, de acordo com a composição e organização estrutural em nível molecular ^{4,7,8}. As nanopartículas podem consistir de uma matriz polimérica, onde a substância ativa pode ficar retida, molecularmente dispersa ou adsorvida, não apresentando óleo na sua composição (nanoesferas). Por outro lado, as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico, contendo um sistema reservatório oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido ou retido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica ^{7,9,10,11}. As nanoemulsões são constituídas por uma fase hidrofílica, uma fase lipofílica e tensoativos, sem a presença do polímero. Estes sistemas também formados por partículas muito pequenas, na faixa de nanômetros ¹¹. Os sistemas carreadores podem, ainda, serem constituídos por lipídeos organizados formando uma matriz lipídica sólida, que recebem a denominação de nanopartículas lipídicas sólidas ¹².

O estrato córneo é a camada mais externa da pele e oferece a principal resistência para a penetração de compostos aplicados topicamente. Conseqüentemente, o número de fármacos utilizados para a liberação transdérmica é bastante limitado ¹³.

Várias substâncias químicas têm sido estudadas e empregadas com o propósito de aumentar a permeação percutânea, como exemplo: o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida, os agentes tensoativos, os dissolventes (propilenoglicóis e álcoois), os ácidos graxos, entre outros ^{14,15}. Entretanto, ao lado da função de aumentar a penetração cutânea dos fármacos, tem-se o inconveniente da toxicidade e irritação associada a estas substâncias ¹⁶, as quais podem causar efeitos indesejáveis, desencadeando muitas vezes processos inflamatórios ^{14,17}.

O veículo no qual a substância ativa é incorporada deve promover não somente a solubilização necessária, mas um maior contato entre a substância e a pele ¹⁸. A encapsulação de fármacos em sistemas nanoparticulados é uma estratégia crescentemente implementada com estes objetivos ¹⁹⁻²¹.

Considerando o exposto, este artigo propõe-se a revisar os aspectos relativos ao uso de preparações farmacêuticas e cosméticas contendo nanopartículas, nanocápsulas e nanoemulsões aplicadas topicamente, descrevendo os possíveis mecanismos de absorção, penetração ou interações com tecidos epiteliais como a pele e as mucosas.

1. Via tópica

A pele representa uma importante e atrativa via para administração de substâncias, sendo considerada como uma rota não invasiva e capaz de evitar a degradação de vários fármacos. A pele não é só uma via para terapia local, mas também, uma via para que fármacos alcancem efeitos regionais ou sistêmicos ^{14,22}. A maior limitação para a administração tópica cutânea é a própria pele, que age como uma barreira, prevenindo a entrada de substâncias estranhas e impedindo a saída de substâncias endógenas ^{23,25}.

A pele é constituída por três camadas: epiderme, derme e camada subcutânea ou hipoderme ²⁶, sendo considerada uma barreira complexa, com organização anatômica e estrutura química especial. Na epiderme, o estrato córneo é formado por camadas de corneócitos organizados e agrupados apresentando de 10-15 camadas com uma espessura variável entre 10-20 μm ²⁷. Os corneócitos são interligados por desmossomas e envolvidos por lipídios intercelulares. A qualidade, a cristalinidade, bem como a quantidade total de lipídios no estrato córneo, determinam a eficiência da barreira cutânea ²⁸. Assim, o estrato córneo e sua estrutura compacta, constitui-se o principal obstáculo para penetração de compostos aplicados topicamente na pele ^{23-25,29-33}.

Mediante a aplicação de formulações tópicas, alguns fatores são capazes de governar a liberação de fármacos e ativos cosméticos na pele. Estes fatores incluem a massa molar e a lipofilia da substância, o tipo de formulação, a presença de promotores de penetração e o

estado físico do estrato córneo²⁶. O grau de hidratação do estrato córneo é também um fator bastante importante para determinação da taxa de absorção percutânea de um determinado fármaco. O nível de hidratação pode ser determinado em função do gradiente de concentração da água entre a derme e a superfície da pele²⁴. A atividade metabólica da pele também deve ser considerada, embora a capacidade de biotransformação, seja consideravelmente mais baixa na pele do que no intestino ou fígado³⁴.

A pele é um órgão dinâmico que tem características de permeabilidade dependentes de vários fatores, tais como, (1) espessura do estrato córneo; (2) integridade do estrato córneo; (3) hidratação do estrato córneo; (4) coeficiente de partição da substância entre veículo e estrato córneo; (5) aplicação de promotores de permeabilidade. Os fatores 1 e 2 são manifestados em função da idade, do sexo, da raça e da região corporal. Os fatores 3 e 5 estão presentes quando a formulação ou as condições de tratamento são alteradas. O fator 4 é decorrente da lipofilia ou solubilidade relativa da substância entre o estrato córneo e o veículo³⁴.

O coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo é de fundamental importância para a substância a ser permeada, estabelecendo-se uma concentração inicial elevada nas primeiras camadas da pele²⁴. A eficácia de um produto para aplicação cutânea pode ser determinada pela relação estabelecida entre os coeficientes de permeabilidade no estrato córneo e a estrutura característica da substância a ser absorvida. O grau de absorção através da estrutura cutânea poderá ser conseqüentemente alterado, variando-se as características físico-químicas do veículo e da substância empregada. Assim, a substância a ser absorvida dependerá do coeficiente de partição nos lipídios superficiais do estrato córneo, da difusão no estrato córneo, da partição entre o estrato córneo e a epiderme viável (mais hidrofílica), da difusão pela epiderme e derme; e finalmente, só para os fármacos e não para

cosméticos, da capacidade de alcançar à circulação sistêmica, através da microvascularização cutânea²⁴.

2. Sistemas nanoestruturados para administração de fármacos e ativos cosméticos

Considerando que a maioria dos fármacos possui propriedades físico-químicas inadequadas para penetrar efetivamente na pele, foram desenvolvidas ao longo dos anos, diferentes estratégias para aumentar a permeação de substâncias através da mesma³⁵. Dentre as diversas estratégias, os sistemas nanoestruturados já investigados são as nanoesferas³⁶ as nanocápsulas^{21,22} as nanoemulsões^{37,38}, as nanopartículas lipídicas sólidas^{19,39}, os lipossomas²⁶ e os niossomas⁴⁰.

Durante a aplicação de preparações coloidais não oclusivas, alterações na composição das formulações tais como, evaporação de algum constituinte do veículo, podem afetar a solubilidade da substância ou provocar mudanças no fluxo das mesmas através da pele. Suspensões coloidais aplicadas epicutaneamente modulam a difusão transdérmica, alterando a atividade da substância e/ou a partição e a difusão do mesmo, influenciando a farmacocinética e a biodistribuição dos ativos permeantes através da pele²⁸.

2.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NPLS) são pequenas partículas classificadas em escala nanométrica (50-1000 nm), as quais foram propostas como sistemas promissores para aplicação tópica^{38,41}. São formadas por uma camada simples, ao contrário dos lipossomas [vesículas fosfolipídicas em bi-camada(s)], que podem formar estruturas lamelares com uma ou várias membranas concêntricas, formadas por lipídeo-água⁴².

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas por excipientes bem tolerados pela pele, sendo que matérias-primas usualmente utilizadas em formulações farmacêuticas e cosméticas podem ser empregadas nestes sistemas ⁴³. As substâncias utilizadas incluem triglicerídeos, glicerídeos, ácidos graxos como, por exemplo, o ácido esteárico e ceras como o palmitato de cetila. Um novo tipo de nanopartícula lipídica utilizando misturas de lipídios sólidos e líquidos tem sido estudada (carreador lipídico nanoestruturado). A partícula lipídica resultante apresenta uma estrutura nanoparticulada sólida com depressões formadas pelo lipídio líquido (óleo) ¹². Para preparação destes sistemas são utilizadas técnicas com ultrassom e homogenizadores de alta pressão (métodos a frio ou quente), emulsificação e evaporação do solvente e microemulsificação ³⁹.

As NPLS apresentam como vantagens a capacidade de proteção química de componentes lábeis contra decomposição, a possibilidade de liberação controlada de substâncias através do estado sólido da matriz lipídica, possibilidades de formação de um filme sobre a pele e propriedades oclusivas ^{12,43}. Jennings e colaboradores ¹⁹ destacam, ainda, o pequeno tamanho das nanopartículas, as quais apresentam grande área superficial, facilitando o contato das substâncias encapsuladas com o estrato córneo e, conseqüentemente, a quantidade capaz de penetrar na pele viável ⁴⁴.

As NPLS apresentam um efeito oclusivo mais intenso, quando comparadas com as emulsões convencionais ou micropartículas ⁴⁵. A oclusão é baseada na formação de um filme, após aplicação na pele, reduzindo a perda transepidérmica de água ⁴⁵. Com o aumento do conteúdo de água na pele, os sintomas de eczema atópico podem ser reduzidos, contribuindo para saúde cutânea ⁴⁶. Entretanto, o efeito oclusivo *in vivo* das NPLS é discutível ⁴⁸. Quando as bases semi-sólidas forem altamente oclusivas, as NPLS adicionadas às formulações, não conferem efeito oclusivo adicional. Por outro lado, um aumento da oclusividade pode ser verificado quando as nanopartículas lipídicas sólidas são adicionadas a emulsões O/A,

aumentando, inclusive, o efeito de hidratação ⁴⁷. A extensão das propriedades oclusivas é ainda dependente de fatores como tamanho da partícula e concentração lipídica ⁴⁸.

A estabilidade físico-química das substâncias carregadas pelas nanopartículas lipídicas sólidas podem ser totalmente diferentes das não carregadas. O efeito da formulação sobre as características físico-químicas da substância associada às NPLS, deve ser investigado individualmente, propiciando desta forma, o desenvolvimento de formulações adequadas para cada caso ⁴⁹. Por exemplo, estudos realizados com retinol e coenzima Q10 em NPLS demonstraram que a incorporação destes ativos à matriz sólida diminuiu a degradação química destas substâncias ⁴³. Estudos têm demonstrado ainda, que a estabilidade física destes sistemas pode ser mantida, quando incorporados em veículos adequados para administração tópica. Os agentes espessantes, umectantes e tensoativos contribuem para estabilizar as formulações e modular a liberação sustentada de substâncias a partir das NPLS ^{50,51}.

Por outro lado, estudos demonstram que as características de penetração, as propriedades do estrato córneo, bem como, os perfis de liberação podem ser controlados por este tipo de sistema. Estudos realizados com a vitamina A (retinol e palmitato de retinol) encapsulada em NPLS, utilizando células de difusão tipo *Franz*, demonstraram a capacidade de liberação destes ativos nas camadas mais superficiais da pele. Os ativos nanoencapsulados alcançaram rapidamente a epiderme viável sem, contudo, provocar um aumento paralelo nas camadas mais profundas da mesma ⁵⁰. De acordo com os autores, os melhores resultados referentes à liberação controlada foram obtidos quando as NPLS de vitamina A foram incorporadas na emulsão O/A, retardando e controlando a liberação do ativo ⁵⁰.

Mei e colaboradores ⁵² estudaram NPLS e microemulsões contendo triptolida (antiinflamatório) para liberação tópica. O fluxo de liberação a partir das NPLS foi maior nas primeiras 6 horas quando comparadas as microemulsões, podendo este comportamento ser decorrente da matriz lipídica sólida das nanopartículas. O fármaco em função da pouca

solubilidade em água apresentou uma atividade termodinâmica aumentada, justificando-se dessa forma, a maior velocidade de difusão nas primeiras horas. Após o período inicial, houve um aumento na permeação do fármaco incorporado na microemulsão, o que pode ser explicado, pela presença de tensoativos na formulação, provocando modificações na barreira lipídica da pele.

Devido à redução da camada protetora de ozônio, há um aumento crescente na incidência de câncer de pele, do tipo melanoma ^{12,52}. A aplicação de NPLS em cremes fotoprotetores tem sido uma área recentemente explorada ⁴⁵. NPLS contendo o filtro solar oxibenzona foram comparadas com uma emulsão convencional de O/A ⁴⁷. Nas emulsões, a oxibenzona encontra-se dispersa na gotícula de óleo, enquanto que nas NPLS, as moléculas de oxibenzona estão incorporadas na matriz cristalina e, conseqüentemente, a mobilidade (difusão) encontra-se diminuída. As NPLS contendo oxibenzona diminuíram em 50 % a taxa de liberação (quando comparadas com a emulsão), promovendo um sistema de liberação sustentada, além de permanecerem um maior tempo na superfície cutânea (adesividade). As NPLS também atuaram como filtro físico e a concentração do filtro químico (oxibenzona) pode ser diminuída mantendo o mesmo fator de proteção solar ²⁰. As NPLS formaram um filme sobre a pele, pois logo após aplicação do produto a água evaporada conduziu à fusão das partículas e à formação do filme lipídico.

Tanto a liberação imediata, bem como a liberação sustentada têm sido relatadas para suspensões de NPLS. Para as aplicações dérmicas, ambas as características são interessantes, a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo ^{19,52}. As NPLS possuem outras vantagens às quais incluem a composição (matérias-primas biologicamente aceitáveis) ⁴³, o processo rápido e efetivo de produção, a possibilidade de evitar o uso de

solventes orgânicos e a produção de suspensões com altas concentrações lipídicas^{12,49}. Com relação às desvantagens, deve-se considerar a baixa capacidade de associação de substâncias, a presença de estruturas coloidais alternativas concomitantes (micelas, lipossomas, nanocristais) e a complexidade do estado físico do lipídio (possibilidade de fusão com super aquecimento). Estes fatores podem vir a causar problemas de estabilidade durante o período de armazenagem ou administração, tais como: gelificação, aumento do tamanho das partículas e expulsão do fármaco³⁹.

2.2. Nanocápsulas, Nanoesferas e Nanoemulsões

O tamanho de partícula recomendado para o uso em formulações farmacêuticas e cosméticas destinadas a aplicação tópica deve ser menor do que 600 nm^{26,52}. Sistemas nanométricos apresentam uma grande área superficial, a qual torna tais sistemas muito satisfatórios para aplicação de ativos lipofílicos encapsulados, propiciando uma liberação homogênea da substância encapsulada⁵⁴. Shim e colaboradores³⁶ estudaram o mecanismo de penetração do minoxidil encapsulado em nanopartículas poliméricas preparadas com dibloco poli(ϵ -caprolactona)-6-poli(etilenoglicol) e os efeitos do diâmetro das nanopartículas na permeação na pele. As nanopartículas (40 a 130 nm) liberaram eficientemente o minoxidil na pele e o folículo piloso representou a principal via de penetração. As nanopartículas menores apresentaram maior penetração do fármaco.

De uma forma geral, estudos relativos à penetração na pele por nanopartículas poliméricas são menos freqüentes do que para lipossomas e NPLS. Por outro lado, investigações sobre as características físico-químicas e estabilidade das nanopartículas poliméricas são mais freqüentes³⁶. Nosso grupo de pesquisa demonstrou através de microscopia eletrônica por criofratura a presença de nanocápsulas intactas, após sua incorporação em hidrogéis (Carbopol 940[®]). A avaliação biológica em ratos demonstrou que

as nanocápsulas de diclofenaco inibiram a formação de tecido granulomatoso de modo significativo em relação ao grupo-controle, não ocasionando lesão no local de aplicação ²¹.

Nanopartículas poliméricas também têm sido propostas como uma nova geração de carreadores para filtro solares UV, com o objetivo de prolongar o tempo de resistência dos mesmos no estrato córneo ^{18,55}. Tanto as suspensões de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila como, as nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila incorporadas em gel, apresentaram perfis moderados de liberação. Este comportamento pode ser explicado pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero [poli(ϵ -caprolactona)] usado na preparação, e também pela alta lipofilia do ativo que previne a sua difusão para o meio receptor. A baixa taxa de difusão inicial do metoxicinamato octila frente às nanocápsulas, sugere que o ativo encontra-se inteiramente encapsulado e não adsorvido na superfície externa das nanocápsulas ¹⁸. Em um outro experimento realizado por Alvarez-Román e colaboradores ⁵⁶, as nanocápsulas contendo metoxinamato de octila foram quantificadas utilizando-se pele de porco e técnicas de *tape-stripping*. Foi observado um aumento da liberação do metoxinamato de octila a partir das nanocápsulas dentro do estrato córneo, não sendo possível detectar a sua presença no compartimento receptor, após 6 horas de experimento. Com base nestes estudos, infere-se que a eficiência das nanocápsulas deve estar relacionada, com a alteração da atividade termodinâmica, facilitando a partição do ativo dentro da membrana, em comparação com as formulações em solução. Também devem ser consideradas as características físicas deste tipo de sistema em que uma elevada área superficial proporciona um maior contato com o estrato córneo epidérmico ⁵⁶. Estudos realizados com microscopia confocal mostraram claramente que os sistemas nanoparticulados (nanopartículas com poliestireno) acumulam-se preferencialmente no ducto folicular, sendo os mesmos dependentes do tempo de contato e do tamanho da partícula. Quanto menor a

partícula (20 nm) maior o acúmulo na região folicular, sendo as nanopartículas também encontradas, nos sulcos epidérmicos ¹.

A atividade bactericida da clorexidina encapsulada em nanocápsulas de poli(epsilon-caprolactona) foi avaliada *in vitro* e os resultados demonstraram que a encapsulação da clorexidina base manteve a atividade antimicrobiana contra várias bactérias, sugerindo sua liberação sustentada ⁵⁷. Critérios quantitativos têm sido utilizados para avaliar e interpretar se as nanoestruturas possuem função de modular ou carrear o fármaco através da pele. Investigações experimentais estão sendo realizadas com o objetivo de avaliar os mecanismos pelos quais estes sistemas (lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões, vesículas deformáveis) liberam os fármacos na pele ²⁸. Para aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos aplicados topicamente, torna-se extremamente necessária a elucidação das propriedades físico-químicas, tanto da pele como dos ativos utilizados para absorção percutânea ¹⁶. Todos estes novos sistemas de liberação devem alcançar o equilíbrio entre os requisitos físico-químicos de estabilidade entre os componentes ativos e os adjuvantes, liberação das moléculas ativas para a pele e preservação contra microorganismos.

Na Tabela 1 encontram-se descritos sistemas nanoestruturados relatados na literatura com características e perfis de liberação específicos. De acordo com os dados analisados, pode-se verificar que estes sistemas podem modificar a atividade do fármaco através de alterações nas propriedades físico-químicas, retardar e controlar a liberação do ativo, bem como, aumentar a adesividade ou o tempo de permanência na pele.

Tabela 1. Sistemas para liberação de fármacos. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NPLS), Nanocápsulas (NC), Nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE).

Sistemas de Liberação	Substância	Tamanho	Resultados	Referência
NC	Metoxicinamato de octila	20-200 nm	Liberação moderada e redução significativa do eritema com o filtro encapsulado. A localização folicular foi favorável para as partículas com menor tamanho.	1
NC NCFluorescente	Metoxicinamato de octila	255 nm 250 nm	A penetração do OMC-NP no estrato córneo foi 3,4 vezes maior do que na emulsão. A liberação da fluoresceína nanoparticulada foi maior do que em solução de propilenoglicol.	18
NC/ Hidrogéis	Diclofenaco	228 nm	Avaliação biológica realizada em ratos demonstrou que os grupos tratados inibiram a formação de tecido granulomatoso, em relação ao controle. Presença de NC intactas nos gel.	21
NC	Minoxidil	40/130 nm	As nanopartículas podem liberar eficientemente o minoxidil na pele e o folículo piloso representou a principal via de penetração.	36
NPLS Emulsão	Oxibenzona	± 200 nm	As NPLS com oxibenzona diminuíram em 50% a taxa de liberação (quando comparadas com a emulsão), promovendo um sistema de liberação sustentada, além de permanecerem um maior tempo na superfície cutânea (adesividade).	47
NPLS Nanoemulsão	Vitamina A	224 nm 186 nm	Os melhores resultados foram obtidos quando as NPLS de vitamina A foram incorporadas no creme O/A, retardando e controlando a liberação do ativo.	50
NPLS Microemulsão	Triptolida	123 nm	NPLS e microemulsões podem servir como eficientes promotores de penetração da triptolida na pele.	52
NC	Clorexidina	200-300 nm	A encapsulação da clorexidina base, manteve a atividade antimicrobiana contra várias bactérias, sugerindo uma liberação sustentada da clorexidina	57

CONCLUSÃO

Os sistemas nanoestruturados, juntamente com a substância veiculada apresentam mecanismos de ação dependentes do tipo e natureza do carreador, do tamanho e das interações físico-químicas apresentadas no sistema e/ou com as membranas biológicas. A avaliação biológica *in vitro* tem como, objetivo avaliar a penetração, a distribuição e o comportamento de cada fármaco encapsulado na pele.

Os sistemas nanoestruturados podem penetrar no estrato córneo, formando uma camada superficial, aumentando o tempo de permanência na pele e proporcionando uma liberação prolongada do ativo. De uma forma geral, estes sistemas são bem tolerados por peles sensíveis ou inflamadas, podendo exercer efeito oclusivo, formando um filme na superfície da epiderme e reduzindo a perda transepidérmica de água.

Finalmente, nanopartículas, nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões representam um recurso importante para a formulação tópica de ativos com pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso, fatores os quais podem comprometer a eficácia das formulações. Deve-se considerar, ainda, que as substâncias altamente lipofílicas têm pouca habilidade para penetrar na pele. A taxa de permeação cutânea, dificilmente pode ser alterada eficientemente pelo uso de formulações galênicas tradicionais. Desta forma, os sistemas nanoestruturados apresentam possibilidades de liberação apropriada da substância no estrato córneo ou na camada de pele viável, tornando-a disponível para o tecido designado.

REFERENCES

1. Alvarez-Román, R., A. Naik, A., Y.N. Kalia, R.H. Guy & H. Fessi (2004) *J. Controlled Release* **99**: 53-62.
2. Monaco, J.P. (2000) “Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intrabucal: Avaliação in vitro da liberação de nimesulida”, Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, SP. 143 p.
3. Yokoyama, M. & T. Okano (1996) *Adv. Drug Delivery Rev.* **21**: 77-80.
4. Soppimath, K.S., T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni & W.E. Rudzinski (2001) *J. Controlled Release* **70**: 1-20.
5. Kreuter (1994) *Nanoparticles*. Marcel Dekker, New York, NY 66: 314-15.
6. Jalón, E.G., M.J. Blanco-Prieto, P. Ygartua, & S. Santoyo (2001) *Int. J. Pharm.* **226**: 181-4.
7. Schaffazick, S.R., S.S. Guterres, L.L. Freitas & A.R. Pohlmann (2003) *Química Nova* **26**: 726-37.
8. Cruz, L.; L.U Soares,; T.D Costa, G. Mezzalira, N.P Silveira, S.S Guterres, A.R. Pohlmann, (2006) *Int. J. Pharm.* **313**: 198-205.
9. Allemann, E., R. Gurny & E. Doelker (1993) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**: 173-91.
10. Barrat, G.M. (2000) *PSTT* **3**: 163-71.
11. Kan, P.; Chen, Z; Kung, R; Lee, C. & I. Chu (1999) *Colloids Surf., B.* v. **15**:117-25.
12. Müller, R.H.; M. Radtke & S.A. Wissing (2002) *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**: 131-55.
13. Maghraby, G.M.M.; A.C. Williams & B.W. Barry (2000) *Int. J. Pharm.* **196**: 63-74.
14. Asbill, C.S. & BB. Michniak (2000) *Pharm. Sci. & Tech. Today* **3**: 36-41.
15. Santoyo, S. & P. Ygartua (2000) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**: 245-50.
16. Yokomizo, Y. & H. Sagitani (1996) *J. Controlled Release* **38**: 267-74.
17. Akimoto, T., T. Aoyagi, J. Minoshima & Y. Nagase (1997) *J. Controlled Release* **49**: 229-41.
18. Alvarez-Román, R., G. Barré, R.H. Guy & H. Fessi (2001) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 191-5.

19. Jennings, V., M. Schäfer-Korting, S. Gohla, (2000) *J. Controlled Release* **66**: 115-26.
20. Wissing, S.A. & R.H. Müller (2002) *Int. J. Pharm.* **242**: 373-5.
21. Milão, D.; M.T. Knorst & S.S. Guterres (2003) *Pharmazie* **58**: 325-9.
22. Miyazaki, S.; A. Takahashi, W. Kubo, J. Bachynsky & R. Löbenberg (2003) *J. Pharm. Pharmaceutical Sci.* **6**: 238-45.
23. Kalia, N.Y. & R.H. Guy (2001) *Adv. Drug Delivery Rev.* **48**: 159-72.
24. Morganti, P.; E. Ruocco, R. Wolf & V. Ruocco (2001) *Clin. Dermatol.* **19**: 489-501.
25. Moser, K., K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia & R.H. Guy, (2001) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 103-12.
26. Verma, D. D., S. Verma, G. Blume & A. Fahr (2003) *Int. J. Pharm.* **258**: 141-51.
27. Foldvari, M. (2000) *Pharm. Sci. & Tech. Today* **3**: 417-25.
28. Cevc, G. (2004) *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**: 671-5.
29. Suhonen, M. T.; J.A. Bouwstra & A. Urtti (1999) *J. Controlled Release* **59**: 149-61.
30. Hadgraft, J. (2001) *Int. J. Pharm.* **224**:1-18.
31. Essa, E.A.; M.C.Boner, B.W. Barry (2002) *J. Pharm. Pharmacol* **54**: 1481-90.
32. Blanco, M.D.; M.V. Bernardo, C. Teijón, R.L. Sastre & M.J. Teijón (2003) *Int. J. Pharm.* **255**: 99-107.
33. Ting, W.W., C.D., Vest & R.D. Sontheimer (2004) *Int. J. Dermatol.* **43**: 538-47.
34. Tauber, U. (1989) "Drug metabolism in the skin: advantages and disadvantages", en "Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives" (Hadgraft, J.R.H. ed.), Marcel Dekker, NewYork, p. 99–112.
35. Bonina, F.P., C. Puglia, T. Barbuzzi, P. Caprariis, F. Palagiano, M.G. Rimoli, & A. Saija (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**; 123-34.
36. Shim, J., H.S. Kang, W. Park, S. Han, J. Kim & I. Chang (2004) *J. Controlled Release* **97**: 477-84.
37. Calvo, P.; M.J. Alonso, J.L. Vila-Jato, J.R. Robinson (1996) *J. Pharm. Pharmacol.* **48**: 1147-52.

38. Müller-Goymann, C.C. (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**: 343-56.
39. Mehnert, W. & K. Mäder (2001) *Adv. Drug Delivery Rev.* **47**:165-96.
40. Shahiwala, A. & A. Misra (2002) *J. Pharm Pharmaceutics Sci.* **5**: 220-25.
41. Mühlen, A.; C. Schwarz, & W. Mehnert, (1998) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**: 149-55.
42. Lima, E.M. & E.R.M. Kedor-Hackmann (1994) *Ver. Bras. Med. São Paulo* **51**: 585-90.
43. Müller, R. H.; K. Mäder & S. Gohla (2000) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**: 161-77.
44. Maia, C.S.; W. Mehnert & M. Schäfer-Korting (2000) *Int. J. Pharm.* **196**: 165-67.
45. Wissing, S.A. & R.H. Müller (2001) *Int. J. Cosm. Sci.* **23**: 233-43.
46. Nangia, A.; S. Patil, B. Berner, A. Boman & H. Maibach (1998) *Int. J. Pharm.* **170**: 33-40.
47. Wissing, S.A. & R.H. Müller (2002) *J. Controlled Release* **81**: 225-33.
48. Wissing, S.A. & R.H. Müller (2002) *Int. J. Pharm.* **242**: 377-9.
49. Lim, S. & C. Kim (2002) *Int. J. Pharm.* **243**: 135-46.
50. Jennings, V., A. Gysler, M. Schäfer-Korting, Gohla, S. (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**: 211-18.
51. Lippacher, A.; R.H. Müller & K. Mäder, (2001) *Int. J. Pharm.* **214**: 9-12.
52. Mei, Z.; H. Chen, T. Weng, Y. Yang & X. Yang, (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**: 189-96.
53. Taylor, C.R.; R.S. Stern, J.J. Leyden & B.A. Gilchrest (1990) *J. Am. Acad. Dermatol.* **22**: 1-15.
54. Bouchemal, K.; S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi, I. Bonnet & N. Zydowicz, (2004) *Int. J. Pharm.* **269**: 89-100.
55. Jiménez, M.M.; J. Pelletier, M.F. Bobin & M.C. Martini (2004) *Int. J. Pharm.* **272**: 45-55.
56. Alvarez-Román, R., A. Naik, Y.N. Kalia & R.H. Guy (2004a) *Pharm. Res.* **21**: 1818-24.
57. Lboutounne, H., J. Chaulet, C. Ploton, F. Falson & F. Pirot (2002) *J. Controlled Release* **82**: 319-34.

PUBLICAÇÃO 4

Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers

Artigo a ser submetido ao periódico International Journal of Pharmaceutics

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Rua dos Andradas 1614, CEP 97010032, Santa Maria, RS, Brazil*

^c *Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, CP 15003, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels
containing nanocarriers

Marta P. Alves^{a, b}, Sílvia S. Guterres^{a,*}, Ana L. Scarrone^b, Marcos Santos^b and Adriana R. Pohlmann^{a,c}

To whom correspondence should be addressed. Tel: (051) 3316-5500

Fax: (051) 3316-5437. E-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

Abstract

The objective of this work was to study the in vitro percutaneous penetration of nimesulide from semi-solid topical formulations containing nanospheres, nanocapsules or nanoemulsion. Nanoprecipitation, interfacial deposition and spontaneous emulsification methods were used to prepare the nanostructured suspension. The hydrodynamic diameters were 252 nm for the nanoemulsion, 277 nm for the nanocapsules and 202 nm for the nanospheres containing nimesulide. The different nanocarrier systems were incorporated in the hydrophilic gels and their ability of delivering the drug into the human skin were investigated using stripping technique and Franz-type diffusion cells. The gel containing nanocapsules (GNM-NC) and the gel containing nanospheres (GNM-NS) released the nimesulide in the same extension into the stratum corneum (SC). On the other hand, for the gel containing nanoemulsion (GNM-NE), the nimesulide was not quantified in SC, but it has been directly permeated for the dermis. The penetration of the nimesulide using the gel containing nanocapsules (GNM-NC) was larger in the deeper skin than using the gel containing nanospheres (GNM-NS) or the one containing nanoemulsion (GNM-NE). The gels containing nanocarriers (GNM-NC, GNM-NS and GNM-NE) were able to release the drug in the viable layer of the skin, comparing to a non-particulated nimesulide-loaded formulation at the same concentration.

Key Words: nimesulide, nanoemulsion, nanocapsules, nanospheres, topical formulation, skin penetration

1. Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are frequently used for the treatment of acute and chronic rheumatoid arthritis, osteoarthritis or musculo-skeletal pain (Babar et al., 1990; Curdy et al., 2001). Although the usual oral dose is well tolerated by patients, several side effects have been reported including gastrointestinal disturbances, headache and dizziness, as well as peptic ulcer (Giuliano et al., 2001; Joseph et al., 2002). In order to circumvent this problem topical formulations of NSAIDs, such as nimesulide, have been reported for the treatment of various inflammatory diseases (Gupta et al., 1996; Sengupta et al., 1998; Dhaon et al., 2000; Doliwa et al., 2001; Curdy et al., 2001). Nimesulide (4-nitro-2-phenoxyethanesulfonamide) selectively inhibits cyclooxygenase-2. It has analgesic activity and it is also widely used for the treatment of rheumatoid arthritis and inflammatory conditions (Rabasseda, 1997; Bernareggi, 1998). Nimesulide presents a very low solubility in water (0.01 mg/ml), an octanol-water partition ($\log P$) of 2.60 and a pK_a value of 6.46 (Gupta et al., 1996; Piel et al., 1997; Fallavena and Schapoval, 1997).

As a general rule, the penetration of a topically formulated active compound into the skin involves two steps: the first is the release of the drug from its vehicle and the second is the penetration of the drug into stratum corneum (Contreras et al., 2005). The stratum corneum, especially the queratin, constitutes the main barrier of skin, as well as it is the rate-limiting step for percutaneous absorption of the drug topically applied (Essa et al., 2002; Blanco et al., 2003; Ting et al., 2004).

Nanoparticles and microparticles have been increasingly investigated to achieve targeted and sustained release of drugs. These systems have been extensively studied for oral and parenteral administration, and they could be useful to deliver several drugs into the skin (Jalón et al.,

2001a). Besides, some investigations have shown that the nanoparticles and liposomes present the tendency to interact with inflamed tissues. This specificity may represent new possibilities of therapy for several rheumatic diseases (Kreuter 1994) by using the encapsulation of NSAIDs or antibiotics in nanocarrier systems as a strategy. Additionally, nanometric systems present an enormous surface area, which makes them suitable for important pharmaceutical and cosmetic applications, such as topical formulations of lipophilic encapsulated drugs for a homogeneous release (Bouchemal et al., 2004).

These carriers present some advantages for topical application since sustained release is important to supply the skin with the drug over a prolonged period of time (Jalón et al., 2001b). Nanoparticles are studied as drug delivery systems because their small sizes allow them to permeate through biological barriers (Couvreur et al., 1995). The mechanism of action of nanoparticles can be attributed to their association with the skin surface. The small particle size ensures close contact with the stratum corneum. That is why the amount of encapsulated agent penetrating into the viable skin facilitates drug transport by changing the vehicle/stratum corneum partition coefficient (Jenning et al., 2000a; Alvarez-Román, et al., 2004). Studies have been conducted in order to explain the mechanism in which the nanocarriers are able to increase the release of some drugs in the skin (Lopez et al., 2000). For instance, vitamin A was released from solid-lipid-nanoparticles into the upper skin layers, but did not penetrate into the deeper skin strata (Jenning et al., 2000b). Quantification of octyl methoxycinnamate (OMC) in the skin using tape-stripping technique has showed that its nanoencapsulation increased 3.4-folds of the level of OMC into the stratum corneum. However, the use of nanoparticles did not increase the skin permeation (it was not possible to detect OMC in the receiver compartment). The confocal images showed that the fluorescence profile observed in the skin after application of Nile Red-loaded nanoparticles was different from that visualized after application of Nile Red dissolved in

propylene glycol. The modified distribution of Nile Red-loaded nanoparticles was due, at least in part, to its altered thermodynamic activity (relative to that in propylene glycol) that resulted in a partition coefficient in the SC increased (Alvarez-Román et al., 2004).

Supersaturated formulations or novel vehicle systems (microemulsions, liposomes and polymeric nanoparticle suspensions) have also been investigated as alternatives to the more “classic” chemical penetration enhancer systems (Alvarez-Román et al., 2004). An understanding of the mechanism(s) of interaction between these novel systems and the skin, as well as the transport pathways within the membrane are required to establish the feasibility of using such nanoparticles to optimize the transport process for each drug.

Taking into account these, the objective of this work was to evaluate the penetration of nimesulide from semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion through the skin using Franz diffusion cells and a tape-stripping technique in order to investigate if these formulations would be able to modify the distribution of nimesulide in the different strata of the full-thickness human skin. The influence of the nanocarriers was compared to a similar gel formulation containing the free drug in the absence of nanocarriers. Additionally, the flux and permeability coefficient of the gel containing nimesulide-loaded nanocapsules, using heat separated human skin membrane, were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nimesulide was obtained from Henrifarma and poly(ϵ -caprolactone) (MW= 80,000) from Aldrich (Strasbourg, France). Caprylic/capric triglyceride, sorbitan monostearate, polysorbate 80, methylparaben, propylparaben, sorbitol and triethanolamine were supplied by Delaware (Porto

Alegre, Brazil). Carbopol 940[®] was acquired from B.F. Goodrich (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

2.2. Preparation of nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion

Formulations containing nimesulide were prepared by nanoprecipitation and interfacial deposition (nanocapsules and nanospheres respectively) (Fessi et al., 1988; Schaffazick et al., 2005; Cruz et al., 2006) and spontaneous emulsification (nanoemulsion). Briefly, the lipophilic solution consisted of triglycerides (3.1 mL), nimesulide (0.150 g), sorbitan monostearate (0.766 g), poly(ϵ -caprolactone) (1.000 g) and acetone (267.0 mL). The organic phase was added under moderate magnetic stirring into an aqueous solution containing polysorbate 80 (0.766 g in 533.0 mL of water). Acetone was removed and water was concentrated by evaporation under reduced pressure and the final formulation was adjusted to 100 mL. Nanosphere suspensions were prepared omitting the oil and nanoemulsion omitting the poly(ϵ -caprolactone). Formulations were made in triplicate.

2.3. Characterization of nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion

The particle sizes, size distributions and polydispersity were measured using Zetasizer[®] (Nano séries, Malvern Instruments). Measurements were made at room temperature (20 °C) using a Brookhaven Instruments (New York, USA) standard setup (BI-200M goniometer, BI-9000AT digital correlator and a BI9863 detection system). A coherent Spectra Physics He-Ne laser (35 mW, $\lambda_0 = 632.8$ nm) was used as light source.

2.4. Preparation of gels containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres, nanoemulsions, nimesulide or control gel

Carbopol 940[®] gels containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC), nanospheres (GNM-NS), and nanoemulsion (GNM-NE) were developed and characterized as previously described (Alves et al., 2005). The gels were constituted of the Carbopol 940[®] (0.2 g), methylparaben (0.2 g), propylparaben (0.1 g), sorbitol (5.0 mL) and triethanolamine (0.2 mL). A similar gel (GC-NM) formulation containing nimesulide (0.13 g), sorbitan monoestearate (0.76 g) and solissorbate 80 (0.76 g), but using water in the place of the nanocarrier formulation was also prepared for comparison. In parallel, a gel (GC) with neither nimesulide nor nanocarriers was also prepared as control. All formulations were prepared in triplicate.

2.4.1. pH determination

The pH values of the suspensions, nanoemulsions and of the gels containing nanocarriers were determined directly in the samples (Micronal B374 potentiometer).

2.4.2. Quantification of nimesulide in the gels

The content of nimesulide in the gels was determined by HPLC after extraction. Approximately 1.0 g of each formulation was accurately weighed and placed in a 50 mL volumetric flask. Acetonitrile was added and the flask was heated at 65 °C until the gel has been completely dissolved. The solution was cooled to room temperature and properly diluted with acetonitrile. After filtration through a 0.45 µm hydrophilic membrane (Durepore[®]), the solutions were injected (10 µL).

2.5. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

The samples were analyzed by HPLC. The system consisted of an SPD-10A Shimadzu detector, LC-10AD Shimadzu pump, SIL-10A Shimadzu injector and Lichrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m) column provided by Merck. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45 v/v). The flow-rate was 1.0 mL min⁻¹; the temperature was 20 °C and the detection at 230 nm. The HPLC method for nimesulide quantification (Nagoji *et al.*, 2002), either in the skin or in the receptor compartment has been previously validated. The detector response was found to be linear at the concentration range from 0.8 to 40.0 μ g/mL ($r > 0.999$). The nimesulide was detected with a retention time of 5.2 min. Accuracy and precision values have been calculated and they were below 2 % (R.S.D.). The limit of quantification of the method was 0.24 μ g/mL. The selectivity of the assay was confirmed by the individual analysis of blank samples from the skin layers and from the receptor compartment of the diffusion cells (United States Pharmacopoeia, 2006).

2.6. Human skin penetration experiments

2.6.1. Preparation and storage of skin samples

Skin samples were obtained from a female patient, who had undergone abdominal plastic surgery. Immediately after excision the subcutaneous fatty tissue of the abdominal region was removed using a scalpel. The skin was wrapped in aluminum foil and stored in polyethylene bags at -20 °C until use.

2.6.2. Dermis-epidermis separation

The flux and permeation coefficient of the nimesulide from the gel containing drug-loaded nanocapsules were determined using heat-separated human skin membrane. Individual portions

of skin were immersed in water at 60 °C for 55 sec. The epidermis (stratum corneum and viable epidermis) was carefully removed from the dermis using forceps (Heard et al., 2003).

The flux (J_{ss}) was determined as the angular coefficient of a curve obtained by plotting the cumulative amount of the permeated drug versus time (Abdulmajed and Heard, 2004). The permeability coefficient (kp) was calculated using equation 1.

$$kp = J_{ss}/c \quad (1)$$

where c is the initial concentration of drug in the vehicle applied to the donor phase.

2.6.3. Diffusion cells preparation

Prior the use, the skin specimens were defrosted and the full-thickness human skin or epidermis were then placed on Franz-type diffusion cells, with nominal diffusion area of 3.14 cm² and a receptor volume contained 6 mL of phosphate buffer solution (pH 7.4). An infinite dose of gel containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC), nimesulide-loaded nanospheres (GNM-NS), nimesulide-loaded nanoemulsion (GNM-NE), nimesulide gel (GC-NM) or control gel (GC) were placed with syringe on the skin surface in the donor chamber. At given time intervals (2, 4, 6, 8, 12, and 24 h) aliquots of 500 µL were collected and the same volume of fresh phosphate buffer solution (pH 7.4) was replaced. The receptor medium was maintained at 37 ± 1 °C and magnetically stirred. The blank vehicles without either nimesulide or nanocarriers (control gel-GC) served as reference in the analytical measurements. Five replicates were used for each formulation.

Additionally, the gel containing nanocapsules (GNM-NC) was tested in heat-separated epidermal membranes, which were placed upon filter paper supports, mounted in Franz-type diffusion cells. The receptor phase consisted of phosphate-buffered (pH 7.4) containing 10 % polyethylene glycol 400 (Babu et al., 2003).

2.6.4. Horizontal skin sectioning and nimesulide extraction

After 24 h of the permeation experiments, the skin was removed and rinsed with distilled water. This procedure was repeated three times and the drug content in the donor compartment, stratum corneum, epidermis/dermis or receptive solution was analyzed according to the procedure described in 2.5.

2.6.4.1. Determination of nimesulide concentration in the stratum corneum and epidermis/dermis

The determination of the drug in the stratum corneum and in epidermis/dermis has been carried out as previously described (Touitou et al., 1998; Lboutounne et al., 2002; Abdulmajed and Heard, 2004; Verma and Fahr, 2004). Consecutive layers of stratum corneum (SC) were removed, adhering to an adhesive (Schoth 3M-19 x 40 mm) tape in the exposed area to the product. The stratum corneum was removed using 15 pieces of adhesive tape for each formulation. The tapes were weighted before and after the extraction of the layers of the skin and the amount of active substance kept in the tapes was extracted with acetonitrile at 60 °C for 60 min and vortexed four times for 30 seconds. The remaining tissue was cut into small pieces and placed in another vial. The drug was extracted with 2 mL of acetonitrile, ultrasonicated for 60 min and vortexed four times for 30 seconds. Samples were filtered through membranes (0.45 µm Durepore[®]) and were analyzed according procedure described in 2.5.

2.6.4.2. Determination of the thickness of the SC

For determination of the thickness of the SC, the adhesive tapes were accurately weighed before and after stripping. The layer thickness was calculated according to the equation 2 (Michel et al., 1992; Verma et al., 2003b).

$$T = \frac{d}{ap} \quad (2)$$

Where T represents the thickness of SC removed (mm), d is the differences in strip weight after and before stripping (μg), a denotes the area of the strip (mm^2) and p is the density of the SC ($p = 1 \times 10^3 \mu\text{g} / 1 \times 10^9 \mu\text{m}^3$).

2.7. Statistical analysis

All the results are expressed as the mean value \pm the standard deviation of the mean and statistically analyzed using variance analysis (ANOVA). Results presenting $p < 0.05$ were considered statistically different. The comparisons among the averages were performed using Tukey's test.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion

Table 1 shows the physicochemical properties of nanocapsule, nanosphere suspensions and nanoemulsion containing nimesulide. For all formulations the diameters are in the sub 300 nm ranges. The diameters are adequate for topical application since the particle sizes recommended in pharmaceutical and cosmetic formulations are lower than 600 nm (Verma et al. 2003a; Bouchemal et al., 2004). Vesicles presenting size around 300 nm are able to deliver their contents in some extension into the deeper layer of the skin (Verma et al. 2003a).

The polydispersity values were below 0.3 (Table 1), which indicates narrow size distributions of the particles and, consequently, good homogeneity of these systems (Verma et al., 2003a). However, some differences have been observed among nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion formulations. The suspension prepared with oil and polymer (nanocapsules)

presented a lower polydispersity (0.12) compared to the formulations prepared in the absence of oil (nanospheres; 0.22) or, in absence of polymer (nanemulsion; 0.25). The pH values ranged from 5.1 to 5.3. Briefly, the results of pH, size, and polydispersity for all formulations were in agreement with the values previously reported for other NSAIDs associated with nanoparticles prepared using polyesters or associated with nanoemulsion (Guterres et al., 1995; Calvo et al., 1996; Müller et al., 2001; Milão et al., 2003, Alves et al., 2005).

3.2. Gels containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres, nanoemulsions or free nimesulide

The nimesulide contents in the gels were dependent on the concentration of drug in each nanocarrier suspension, which was used as aqueous phase in each hydrogel formulation. In this way, gels presented final nimesulide concentrations of 1300 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (nanocapsules: GNM-NC), 1230 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (nanospheres: GNM-NS) and 1270 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (nanoemulsion: GNM-NE). Similar gel formulation (GC-NM) containing 1300 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ of free nimesulide but using water in the place of nanocarrier suspension was also prepared for comparison.

Furthermore, all gel formulations presented pH values close to 7.0, which is adequate for the cutaneous administration. The barrier function of the stratum corneum is unlikely to be compromised when treated with a vehicle which pH is in the range of 3.5 to 8.5 (Sznitowska et al., 2001).

3.3. Penetration experiments

The ability of the different drug-loaded nanocarriers incorporated in the hydrophilic gels (GNM-NC, GNM-NS, GNM-NE) in delivering the drug into the human skin was investigated, using the skin stripping technique and Franz-type diffusion cells (Franz, 1975). These studies were

accomplished with the objective of evaluating the influence of the composition and the type of structure of the different nanocarriers on the nimesulide penetration in human skin.

The drug was detected ($p > 0.05$) in the stratum corneum for the gel containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC) ($1.29 \pm 0.52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Fig. 1) and the gel containing nimesulide-loaded nanospheres (GNM-NS) ($1.18 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Fig. 1). On the other hand, for the gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion (GNM-NE), no drug was detected in this layer. The formulations prepared with poly(ϵ -caprolactone) (GNM-NC and GNM-NS) were the only that presented retention in the stratum corneum. This behavior suggests a higher affinity of the polymeric formulations (GNM-NC and GNM-NS) with the horny layer. The stratum corneum is considered to be the diffusional barrier of mammalian skin for water and the most solutes (Verma; Fahr, 2004). This external layer of the skin provides the principal barrier to the percutaneous permeation of topically applied substances (Maghraby et al., 2000).

The presence of nimesulide in the deeper skin was significantly higher ($p < 0.05$) for the gel containing drug-loaded nanocapsules (GNM-NC) ($5.09 \pm 1.22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) than for the gels containing drug-loaded nanospheres (GNM-NS) ($2.93 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) or drug-loaded nanoemulsion (GNM-NE) ($3.46 \pm 0.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Fig. 1). For the gels GNM-NE and GNM-NS the deeper skin presented statistically similar amounts of nimesulide ($p > 0.05$). The gel containing nanocapsules (GNM-NC) presented a larger penetration of nimesulide in stratum corneum and in the deeper skin (Table 2). The differences of this formulation in relation to the nanoemulsion and to the nanospheres are the presence of the polymer in the former and the oil in the latter.

The drug was not detected in the receptor compartment solution for none of the tested formulations (Fig 1.). This result is in agreement with previous studies, which reported that particulated drug carriers (microparticles and nanoparticles) improve the drug residence in the

skin without increasing transdermal transport (Asbill and Michniak, 2000; Lboutounne et al., 2002; Alvarez-Román et al., 2004). Additionally, the high specific area of the carrier facilitates the contact of the encapsulated molecules with the stratum corneum (Jenning et al., 2000b; Maia et al., 2000; Alvarez-Román et al., 2004). The function of these particles is to deliver an ingredient to the upper layer of the skin, and in optimal applications to prolong the time in which this ingredient remains on the skin (Magdassi, 1997; Jennings et al., 2000b; Barratt 2000; Alvarez-Román et al., 2001, Lboutounne et al., 2002).

Table 2 shows the concentration of the drug applied on the surface of the skin (donor compartment) for each formulation. These formulations were maintained in contact with the skin for 24 hours, and nimesulide was quantified at the end of the experiments. The concentration of the nimesulide in the skin surface after 24 h for the gels containing nanocapsules (GNM-NC), nanospheres (GNM-NS), nanoemulsion (GNM-NE) and gel without nanocarriers (GC-NM) were 347.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 356.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 373.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and 424.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively (Table 2).

The results showed that 100 % of the drug was retained in the gel without nanocarriers (GC-NM), indicating that the nimesulide was not diffused from the vehicle to the skin surface in the formulation without nanocarriers. The modified distribution of nimesulide when delivered via nanoparticles is probably due to alterations in the thermodynamic activity, increasing the drug diffusion through the vehicle. The ability of a drug in a topical formulation to permeate the skin and to exert its effect depends on two consecutive events. The drug must first diffuse out from the vehicle to the skin surface and then it must permeate this barrier. When a drug molecule diffuses from an aqueous donor phase through a lipophilic membrane to a receptor phase it experiences two types of resistance: the resistance of diffusion in the aqueous phase and the resistance of diffusion through the membrane. Both steps are dependent upon the physicochemical properties of the drug, vehicle and barrier (Nishihata et al., 1988; Kriwet and Müller-Goymann, 1995).

The apparent partition coefficient ($K_{SC/veh}$) of nimesulide was determined after successive tape stripping of the stratum corneum (Table 3). The nimesulide concentration after 24 h of treatment was calculated for a thickness of approximately 14.8 μm of the horny layer. The apparent partition coefficients ($K_{SC/veh}$) of nimesulide between stratum corneum and the gel did not show significant difference ($p > 0.05$) between the GNM-NC ($1300 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) and the GNM-NS ($1230 \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

Since the gel containing nimesulide-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules (GNM-NC) showed the higher drug penetration in the skin compared to the nanospheres and the nanoemulsion, it was used for determining the flux and the permeability coefficient of nimesulide.

The gel containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC) demonstrated favorable skin penetration characteristics. The flux (J_{ss}) and permeability coefficients (kp) were $0.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ and $9.42 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{h}$, respectively. The results showed that nimesulide permeated the heat-separated human skin more easily than the whole skin. The analyses of in vitro skin absorption of lipophilic compounds, based on receptor fluid levels only, should be treated with extreme caution. All information on the fate of the drug in the skin is required to demonstrate whether it remained in the stratum corneum and/or in deeper layers of the skin (Sandt et al., 2004; Wilkinson, et al., 2006).

4. Conclusions

The gels containing nimesulide-loaded nanocarriers were able to promote the drug penetration in the stratum corneum and/or in the layer of viable skin compared to a nimesulide-loaded non-particulated formulation. The encapsulation of the drug in those nanocarriers modified the in vitro release and the diffusion parameters of nimesulide (relative to those determined for the non

particulated formulation), and consequently altered the distribution of the drug in the different human skin layers. The gel containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC) and the gel containing nimesulide-loaded nanospheres (GNM-NS) presented significant similar drug penetration into the stratum corneum. On the other hand, the gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion (GNM-NE) showed no drug in the stratum corneum, but the drug has permeated directly for the dermis. The gel containing nanocapsules (GNM-NC) showed the higher penetration of nimesulide in the skin as compared to the nimesulide-loaded nanospheres and nimesulide-loaded nanoemulsion. Briefly, for the first time, this comparative study demonstrated the influence of the presence of the polymer and of the type of nanocarrier (matricial, vesicular or emulsion) on the penetration of a drug through the human skin.

Acknowledgements

The authors thank FAPERGS, CNPq/Brasília and Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT e Rede de Nanocosméticos CNPq/MCT.

References

- Abdulmajed, K., Heard, C.M., 2004. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. *Int. J. Pharm.*, 280, 113-124.
- Alves P.M., Pohlmann A.R., Guterres S.S., 2005. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, 60, 900-904.
- Alvarez-Román, R., Barré, G., Guy, R.H., Fessi, H., 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52, 191-195.
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., 2004. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res.*, 21, 1818-1824.
- Asbill, C.S., Michniak, B.B., 2000. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharm. Sci. Technol. To.*, 3, 36-41.
- Babar, A., Solanki, U.D., Cutie, A.J., Plakogiannis, F., 1990. Piroxicam release from dermatological bases: in-vitro studies using cellulose membrane and hairless mouse skin. *Drug Dev. and Ind. Pharm.*, 16, 523-540.
- Babu, R.J., Kanikkannan, N., Kikwai, L., Ortega, C., Andega, S., Ball, K., Yim, S., Singh, M. 2003. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. *J. Control. Rel.*, 86, 49-57.
- Barratt, G.M. 2000. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *PSTT*, 3, 163-171.
- Bernareggi, A. 1998. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin. Pharmacokinet*, 35, 247-274.
- Blanco, M.D., Bernardo, M.V., Teijón, C., Sastre, R.L., Teijón, M.J., 2003. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels *Int. J. Pharm.*, 255, 99-107.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H., Bonnet I., Zydowicz, N. 2004. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *Int. J. Pharm.*, 89-100.
- Calvo, P., Alonso M.J., Vila-Jato, J.L., Robinson, J.R., 1996. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1147-52.
- Contreras, M.J.F., Soriano M.M.J., Diéguez A.R. 2005. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid

liposomes. *Int. J. Pharm.*, 297, 134-145.

Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F., 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41, 2-13.

Cruz, L., Soares, L.U., Costa, T.D., Mezzalira, G., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2006. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers *Int. J. Pharm.*, 313, 198-205.

Curdy, C., Kalia, Y.N., Naik, A., Guy, R.H. 2001. Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. *J. Control. Rel.*, 76, 73-79.

Dhaon, B.K., Singh, O.P., Gupta, S.P., Maini, L., Sharma, D.K., Bhutani, S. 2000. Efficacy and safety of nimesulide transdermal gel versus diclofenac and piroxicam gel in patients with acute musculoskeletal condition. *Indian J. Orthop.*, 34, 288-292.

Doliwa, A., Santoyo, S., Ygartua, P. 2001. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. *Int. J. Pharm.*, 229, 37-44.

Essa, E.A., Bonner, M.C., Barry, B.W., 2002. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1481-1490.

Fallavena, P.R.B., Schapoval, E.E.S., 1997. pK_a determination of nimesulide in methanol-water mixtures by potentiometric titrations. *Int. J. Pharm.*, 158, 109-112.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J., 1988. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. European Patent, 0274961 A1.

Franz, T.J., 1975. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.*, 64, 190-195.

Giuliano, F., Ferraz, J.G.P., Pereira, R., Nucci, G., Warner, T.D. 2001. Cyclooxygenase selectivity of non-steroid anti-inflammatory drugs in humans: ex vivo evaluation. *Eur. J. Pharmacol.*, 426, 95-103.

Gupta, S.K., Prakash, J., Awor, L., Joshi, S., Velpandian, T., Sengupta, S., 1996. Anti-inflammatory activity of topical nimesulide gel in various experimental models. *Inflammation Res.*, 45, 590-592.

Guterres, S. S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F.; Devissaguet, J., 1995. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, 113, 57-63.

Heard, C.M., Monk, B.V., Modley, A.J., 2003. Binding of primaquine to epidermal membranes and keratin. *Int. J. Pharm.*, 257, 237-244.

- Jalón, E.G., Blanco-Prieto M.J., Ygartua, P., Santoyo, S. 2001a. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. *J. Control. Rel.*, 75, 191-197.
- Jalón, E.G., Blanco-Prieto, M.J., Ygartua, P., Santoyo, S. 2001b. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 226, 181-184.
- Jenning, V., Schäfer-Korting, M., Gohla, S. 2000a. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J. Control. Rel.*, 66, 115-126.
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., Gohla, S. 2000b. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 49, p. 211-218.
- Joseph, N.J., Lakshmi, S., Jayakrishnan, A. 2002. A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *J. Control. Rel.*, 79, 71-19.
- Kreuter, 1994. Nanoparticles. *J. Colloidal drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, NY 66, 314-315.
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C.C., 1995. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, 125, 231-242.
- Lboutounne, H., Chaulet, J., Ploton, C., Falson, F., Pirot, F., 2002. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Rel.*, 82, 319-334.
- Lopez, R., Collett, J.H., Bentley, M.V.L. B., 2000. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *Int. J. Pharm.*, 200, 127-132.
- Magdassi S., 1997. Delivery Systems in cosmetics. *Colloids Surf.*, 123-124, 671.
- Maghraby, G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 2000. O estradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.*, 196, 63-74.
- Maia, C.S., Mehnert, W. Schäfer-Korting, M., 2000. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *Int. J. Pharm.*, 196, 165-167.
- Michel, C., Purmann, T., Mentrup, E., Seiller, E., Kreuter, J., 1992. Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials. *Int. J. Pharm.*, 84, 93-105.
- Milão, D., Knorst, M. T., Guterres, S. S., 2003. Hydrophilic Gel Containing Nanocapsules of Diclofenac: Development, Stability Study and Physico-chemical Characterization. *Pharmazie*, 58, 325-329.

Müller, C.R., Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., de Lucca Freitas L., Pesce da Silveira, N., Dalla Costa, T., Guterres, S.S., 2001. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*, 56, 864 – 867.

Nagoji, D.E.V., Panda, J., Rao, S.S., Patro, S.S., 2002. Determination of nimesulide in dosage formulations by reverse phase high performance liquid chromatography. *Asian J. Chem.*, 14, 339-343.

Nishihata, T., Kamada, A., Sakai, K., Takahahi, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K., Tabat, Y., Keigami, M., Miyagi, T., Tatsumi, N., 1988. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. *Int. J. Pharm.*, 46, 1-7.

Piel, G., Pirotte, B., Delneuvillie, I., Neven, P., Llabres, G., Delarge, J., Delattre, I., 1997. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, 86, 475-479.

Rabasseda, X. 1997. Safety profile of nimesulide: ten years of clinical experience. *Drugs today*, 33, 41-50.

Sandt, J.J.M., Burgsteden, J.A., Cage, S.; *et al.* 2004. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 271-181.

Sengupta, S., Velpandian, T., Kabir, S.R., Gupta, S.K. 1998. Analgesic efficacy and pharmacokinetics of topical nimesulide gel in healthy human volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac and placebo. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 54, 541-547.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., de Cordova, C.A., Creczynski-Pasa, T.B., Guterres, S.S., 2005. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int. J. Pharm.*, 289, 209-13.

Sznitowska, M., Stanislaw, J., Baczek, A. 2001. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *J. Control. Rel.*, 76, 327-335.

Ting, W.W., Vest, C.D., Sontheimer, R.D., 2004. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *Int. J. Dermatol.*, 43, 538-547.

Touitou, E., Meidan, V.M., Horwitz, E., 1998. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J. Control. Rel.*, 56, 7-21.

United States Pharmacopoeia, Validation of Compendial Methods, 29th ed. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2006.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003a. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharm.*, 258, 141-151.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003b. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55, 271-277.

Verma, D.D., Fahr, A., 2004. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *J. Control. Rel.*, 97, 55-66.

Wilkinson, S.C., Maas, W.J. M., Nielsen, J.B., Greaves, L.C., Van de Sandt, J.J., Williams, F.M., 2006. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 25, 1-9.

Table 1: Parameters of nanoemulsion, nanospheres and nanocapsules characterization (Mean \pm standard deviation).

Formulations	Particle size (nm)	Polydispersity index	pH
NC	277 \pm 0.00	0.12	5.2 \pm 0.10
NS	202 \pm 3.54	0.22	5.1 \pm 0.15
NE	252 \pm 0.35	0.25	5.3 \pm 0.08

NE, nimesulide-loaded nanoemulsion suspension; NC, nimesulide-loaded nanocapsule suspension; NS, nimesulide-loaded nanosphere suspension.

Table 2: Amount of nimesulide delivered from different formulations into the strata of human abdominal skin using a Franz-type diffusion cell in vitro after 24 h (mean \pm SD n=5).

Formulations	Total skin ¹ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Drug dose applied onto SC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Surface skin after 24h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
GNM-NC	6.40 \pm 1.54 ^a	414.0	347.1 \pm 29.53 ^b
GNM-NS	4.10 \pm 0.65 ^b	391.7	356.1 \pm 11.35 ^b
GNM-NE	3.46 \pm 0.67 ^b	404.4	373.2 \pm 30.83 ^b
GC-NM	-	414.0	424.2 \pm 20.32 ^a

GNM-NC, gel containing nimesulide-loaded nanocapsule; GNM-NS, gel containing nimesulide-loaded nanosphere; GNM-NE, gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion; GC-NM, gel containing nimesulide

¹Total skin: Stratum corneum + deeper skin

a-b: the averages signed with different letters (inside of the same column) were considered statistically different in agreement with Tukey's test ($p < 0.05$).

Table 3: Assessment by tape stripping of stratum corneum (SC) for nimesulide penetration into human skin (Mean \pm SD n = 5).

Formulations	Drug absorbed by SC ^a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Drug concentration in SC ^b ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Applied drug dose absorbed ^c (%)	$K_{\text{SC/veh}}$ ^d
GNM-NC	1.29 \pm 0.46	871.6 \pm 309,7	0.31 \pm 0,11	0.67 \pm 0,24
GNM-NS	1.18 \pm 0.28	797.3 \pm 187,0	0.30 \pm 0,07	0.65 \pm 0,15
GNM-NE	not detected	-	-	-
GC-NM	not detected	-	-	-

GNM-NS, gel containing nimesulide-loaded nanosphere; GNM-NE, gel containing nimesulide-loaded nanoemulsion; GNM-NC, gel containing nimesulide-loaded nanocapsule; GC-NM, gel containing nimesulide

^aAmount of drug (nimesulide) absorbed into the SC after 24 h exposure treatment

^bConcentration of drug in the SC after 24 h exposure. Calculated as the ratio of the amount of nimesulide ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the SC to the SC thickness assumed to be equal to 14.8 μm

^cApplied drug dose absorbed calculated as the ratio of the amount of nimesulide ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the SC to the nimesulide dose applied

^dPartition coefficient ($K_{\text{SC-veh}}$) of the nimesulide between the SC and the formulation: calculated as the ratio of the nimesulide concentration in the SC^b to nimesulide concentration in the vehicle (NC-1300 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; NS-1230 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

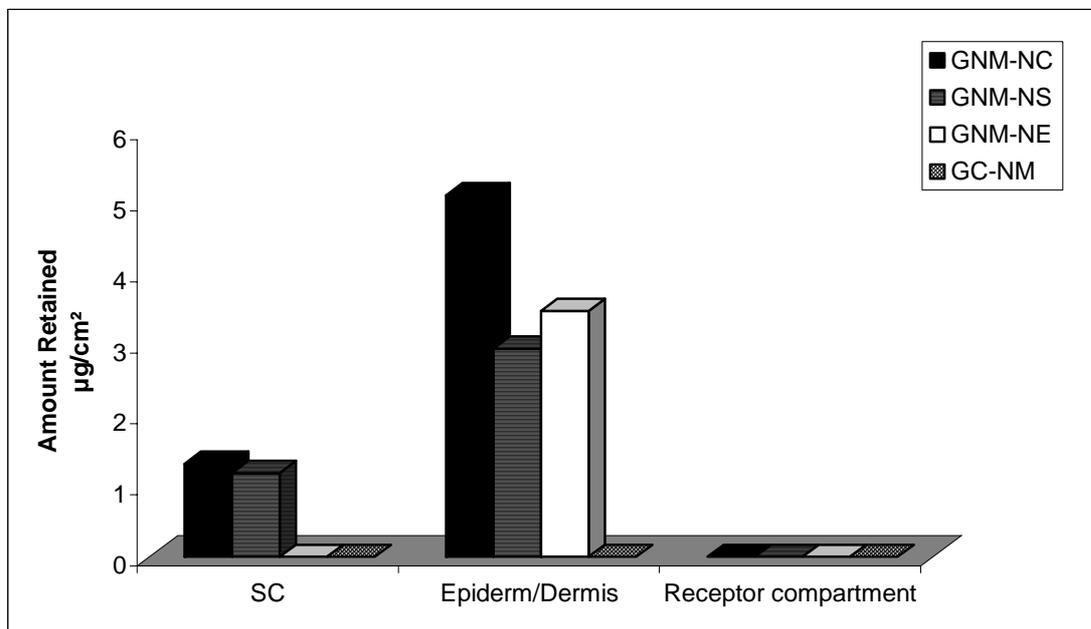


Fig.1. Distribution of nimesulide in the SC (thickness assumed to be equal to 14.8 μm) and deeper skin (Epidermis/Dermis) following topical administration of gel containing nimesulide-loaded nanocapsules (GNM-NC); nanospheres (GNM-NS); nanoemulsion (GNM-NE) and gel containing nimesulide (GC-NM).

DISCUSSÃO GERAL

Os métodos de deposição interfacial e nanodispersão foram utilizados neste experimento possibilitando a obtenção de nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsões (NE) de nimesulida. A análise das características físico-químicas dos sistemas estudados demonstrou que os diâmetros obtidos são compatíveis com os sistemas nanoestruturados (cerca de 300 nm). As taxas de associação situam-se próximas a 99 % e os valores de pH entre 5,1-5,3; também encontram-se de acordo com os valores observados para fármacos antiinflamatórios associados a nanoestruturas (Guterres *et al.* 1995; Calvo *et al.*, 1996; Müller *et al.* 2001; Milão *et al.* 2003).

Cabe ressaltar que a concentração de nimesulida utilizada nas formas farmacêuticas avaliadas neste estudo, ficou limitada à concentração presente nos sistemas nanoestruturados e ao volume aquoso das formulações. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Nagoji *et al.*, 2002), sendo o método previamente validado. A faixa de concentração testada foi de 0,8 a 40 µg/mL ($r > 0,999$) e os resultados atenderam às especificações de linearidade, precisão e exatidão (United States Pharmacopoeia, 2006). Desta forma, as preparações semi-sólidas apresentaram concentração final de 1,30 mg de nimesulida/g de gel contendo nanoemulsão; 1,29 mg de nimesulida/g de gel com nanocápsulas e 1,26 mg de nimesulida/g de gel com nanoesferas.

As formas farmacêuticas plásticas apresentaram características organolépticas satisfatórias após a incorporação das suspensões. A incorporação da nimesulida diretamente na base do gel, ocasionou uma coloração amarelada, o que o diferenciou das bases onde a nimesulida foi adicionada veiculada às suspensões nanoestruturadas, as quais apresentaram-se com uma coloração levemente amarelada. Esta mudança de característica deve-se provavelmente ao próprio sistema nanoestruturado ao qual o fármaco foi associado, o que poderá contribuir, em hipótese, para que a pele não fique com tom amarelado, quando a nimesulida for utilizada topicamente.

Todas as formulações de géis analisadas neste estudo foram caracterizadas como sistemas não-newtonianos apresentando comportamento pseudoplástico, sendo que os reogramas foram ajustados pelo modelo de Ostwald. Experimentalmente, nenhum fenômeno de tixotropia foi detectado para formulações testadas e a

incorporação dos nanocarreadores não modificou o tipo de fluxo apresentado por estes sistemas. Após o período de estocagem houve uma diminuição do índice de consistência para os géis contendo nanocarreadores comparados ao gel controle e ao gel com o fármaco livre.

Os diferentes sistemas nanocarreadores incorporados nos géis hidrofílicos, após serem desenvolvidos e caracterizados, foram investigados em função do potencial de liberação do fármaco na pele, usando célula de difusão tipo Franz e técnica de *tape stripping* em pele humana. Todas as formulações de géis contendo nanocarreadores apresentaram valores de pH em torno de 7,0, sendo os mesmos considerados adequados para administração cutânea.

Os experimentos foram realizados ainda, com o objetivo de avaliar a influência da composição e o tipo de estrutura dos diferentes nanocarreadores na penetração do fármaco na pele. O modelo assumido pelos sistemas de liberação tópica, em relação ao efeito do solvente na penetração e na retenção do soluto, tem sido um dos aspectos mais difíceis de ser estimado teoricamente. Experimentos para determinação destes efeitos são frequentemente complexos de serem interpretados, devido à natureza do estrato córneo e a interação com o veículo (Cross *et al.*, 2001). Além do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas ou da avaliação de produtos farmacêuticos e cosmecêuticos, estes testes também são necessários para obtenção de informações sobre os efeitos de fármacos e/ou excipientes na função de barreira da pele (Wagner *et al.*, 2001).

No presente estudo o fármaco foi detectado no estrato córneo para o gel contendo nanocápsulas ($1,29 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (GNM-NC) e para o gel contendo nanoesferas de nimesulida ($1,18 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (GNM-NS), não havendo diferença significativa entre estes dois valores ($p > 0,05$) (Tabela 3, publicação 4). Por outro lado, o fármaco não foi detectado no estrato córneo para o gel contendo nanoemulsão de nimesulida. As formulações preparadas com o polímero poli(ϵ -caprolactona) (GNM-NC e GNM-NS) apresentaram retenção do fármaco no estrato córneo, sugerindo, desta forma, uma maior afinidade deste tipo de formulação com a camada córnea.

A presença de nimesulida na epiderme/derme foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o gel contendo nanocápsulas ($5,09 \pm 1,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) do que para o gel

contendo nanoesferas ($2,93 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou nanoemulsão ($3,46 \pm 0,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de nimesulida. Os géis contendo nanoemulsão e nanoesferas não apresentaram diferença significativa de penetração entre eles ($p > 0,05$). O gel contendo nanocápsulas apresentou uma maior penetração do fármaco tanto no estrato córneo como na epiderme/derme. A diferença desta formulação, em relação à nanoemulsão é o polímero e, em relação às nanoesferas, é a presença do óleo na sua constituição.

Os géis com ou sem nanocarreadores colocados no compartimento doador (superfície da pele) foram quantificados após 24 horas de experimento. A concentração de nimesulida no gel sem nanocarreador foi de $424,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, para o gel contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão as concentrações foram respectivamente $347,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $356,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $373,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabela 2, publicação 4). Os resultados demonstraram que 100 % do fármaco ficou retido no gel sem nanocarreador, sugerindo que a nimesulida não foi difundida do veículo para superfície da pele. A alteração na distribuição da nimesulida, quando liberada via nanopartículas, deve-se provavelmente a alterações na atividade termodinâmica do fármaco, aumentando desta forma, a difusão do mesmo através do veículo.

A nimesulida não foi detectada na solução do compartimento receptor para nenhuma das formulações testadas. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios, os quais relatam que carreadores como micropartículas ou nanopartículas podem aumentar a resistência na pele sem, contudo, aumentar o transporte transdérmico (Asbill; Michniak, 2000; Lboutounne *et al.*, 2002; Alvarez-Román *et al.*, 2004).

Os estudos de permeação *in vitro* são essenciais para avaliar o comportamento do fármaco na pele e através dela. Efetivamente, três parâmetros principais precisam ser considerados: o tipo de membrana que será usada para avaliar a permeação do fármaco; o modelo matemático que será utilizado para caracterizar a permeação do fármaco na pele; e o modelo da célula de difusão que será adotado para realização do estudo (Kattan *et al.*, 2000).

Nos estudos *in vitro* de produtos tópicos é importante observar que a concentração de fármaco na solução receptora não reflete por si só, a influência da formulação na atividade do produto. Assim, a determinação da quantidade de fármaco

retida na membrana natural leva a dados mais concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade do produto. Este procedimento tem sido empregado por muitos autores no estudo de penetração cutânea de fármacos (Pellet *et al.*, 1997a; Touitou *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2003; Sandt *et al.*, 2004; Abdulmajed e Heard, 2004).

A determinação do fármaco dentro da pele requer a remoção do excesso de formulação, seguida por um processo de extração com um solvente adequado. Técnicas analíticas apropriadas e sensíveis, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Gasosa ou Cintilografia, podem ser empregadas para quantificação do fármaco extraído (Touitou *et al.*, 1998). Estes estudos são necessários para determinar que tipo de atividade o fármaco será capaz de exercer, ou seja, se o mesmo irá se localizar na pele ou atravessará a mesma, atingindo a corrente circulatória. Para sistemas de liberação tópica, é desejável que o produto apresente acúmulo de fármaco na pele e mínima permeação, enquanto que para liberação sistêmica o oposto será desejável (Touitou *et al.*, 1998).

Em função do gel contendo nanocápsulas apresentar uma maior penetração da nimesulida na pele, foram realizados estudos para determinação do fluxo e do coeficiente de permeabilidade do mesmo. O fluxo (J_{ss}) e o coeficiente de permeabilidade (K_p) foram $0,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e $9,42 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{h}$, respectivamente. Os resultados demonstraram que a nimesulida permeou a pele (estrato córneo/epiderme) mais facilmente que a pele íntegra, ou seja, quando todas as camadas de pele foram usadas no experimento.

CONCLUSÕES

- As nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida podem ser incorporadas em géis hidrofílicos, resultando em formas farmacêuticas com características organolépticas satisfatórias e adequadas para administração tópica da nimesulida.
- Todas as formulações avaliadas apresentaram comportamento pseudoplástico, não ocorrendo alterações no comportamento reológico dos géis, após incorporação dos nanocarreadores.
- Os géis contendo nimesulida incorporada em nanocarreadores foram capazes de promover a penetração do fármaco no estrato córneo e/ou na camada de pele viável.
- A incorporação do fármaco nos nanocarreadores modificou os parâmetros de liberação e difusão da nimesulida, com relação ao fármaco livre.
- Os géis contendo nanocápsulas e nanoesferas de nimesulida apresentaram liberação do fármaco no estrato córneo. O gel contendo nanoemulsão permeou o fármaco diretamente para derme, não sendo detectado no estrato córneo.
- O gel contendo nanocápsulas propiciou maior penetração de nimesulida, quando comparado ao gel com nanoesferas ou ao gel com nanoemulsão contendo nimesulida.
- Em conjunto, estes estudos demonstraram a influência do polímero e do tipo de nanocarreador (matricial, vesicular ou emulsão) na penetração da nimesulida em pele humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMAJED, K.; HEARD, C.M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n.280 (1-2), p. 113-24, 2004.

AKIMOTO, T.; AOYAGI, T.; MINOSHIMA, J.; NAGASE, Y. Polymeric percutaneous drug penetration enhancer Synthesis and enhancing property of PEG/PDMS block copolymer with a cationic end group. **Journal of Controlled Release**, v. 49, p. 229-241, 1997.

ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.39, n.5, p. 173-191, 1993.

ALLEN, L.V. Métodos analíticos de controle de qualidade: Medidas de viscosidade. **International Journal of Pharmaceutical Compounding** (ed. Bras), v.6, p.47, 2004.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, p. 96, 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n.2, p. 191-195, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R. NAIK, A., KALIA, Y.N. and GUY, R.H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.21 n.10, p. 1818-1824, 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN, R. NAIK, A., KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004b.

ALVES, P.M.; FUNCK, J.A.B.; BITTENCOURT, C.F. Influência dos promotores de absorção na permeação transdérmica do piroxicam em bases dermatológicas. **Pharmaceutical Technology** (Brasil), v. 3, n.2, p. 40-45, 2000.

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. 900-4, 2005.

ANSEL, H.C.; ALLEN, L.V; POPOVICH, N.G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, Philadelphia**: Lippincott W.; Wilkins, 1999. p. 595.

ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; LEJEUNE, B.; POURRAT, A.

Formulations of propolis extract emulsions. I. O/W creams based on non-ionic surfactants and various consistency agents. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 21, p. 1907, 1995.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3 n.1, p. 36-41, 2000.

BABAR, A.; SOLANKI, U.D.; CUTIE, A.J.; PLAKOGIANNIS, F. Piroxicam release from dermatological bases: in-vitro studies using cellulose membrane and hairless mouse skin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n.3, p. 523-540, 1990.

BABU, R.J., KANIKKANNAN, N., KIKWAI, L., ORTEGA, C., ANDEGA, S., BALL, K., YIM, S., SINGH, M. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. **Journal Controlled Release**, 86, p. 49-57, 2003.

BADER; STEFANO; HAUSERMANN; ENRIQUE; MONTI; TIZIANA. (HELSINN HEALTHCARE S.A.) Nimesulide topical formulations in the form of liquid crystals **United States Patent**: 6,288,121, 1999.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, v. 3, n.5, p. 163-171, 2000.

BARRY, B. in AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2^a ed., Artmed: São Paulo, 2005. 677 p.

BECK, R.C.R. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas contendo dexametasona**. Avaliação da atividade antiinflamatória do fármaco associado, 2000. 135 p. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria.

BECKER, P.; Cosmetic Emulsions in: **Encyclopedia of Emulsion Technology: Applications**, BREUER, M. M.; Marcel Dekker-Taylor & Francis-CRC, 1985. 744 p.

BEETGE, E.; PLESSIS, J.; MÜLLER, D. G.; GOOSEN, C.; FRANCOIS, J. R. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 261-264, 2000.

BENTHLEY, M.V.L.B. **Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides**: Avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia in vitro, 1994. 155 p. Tese (Doutorado) Curso de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas,

São Paulo.

BERNAREGGI, A. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. **Clinical Pharmacokinet**, v.35, n.4, 247-274, 1998.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, M.J. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p. 99-107, 2003.

BONINA, F.P.; PUGLIA, C.; BARBUZZI, T.; CAPRARIIS, P.; PALAGIANO, F., RIMOLI, M.G.; SAIJA, A. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 14, n.2, p. 123-134, 2001.

BOOULMEDARAT, L; GROSSIORD, J.L.; FATTAL, E.; BOCHOT, A. Influence of methyl- β -cyclodextrin and liposomes on rheological properties of Carbopol 974[®] NF gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, p. 59-64, 2003.

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

BRICEÑO, M.I. **Rheology of suspensions and emulsions** In: Nielloud, F.; Marti-Mestres, G. (ed.) *Pharmaceutical Emulsion and Suspensions*, New York, p. 557-608 2000.

BROWN, M.B.; HANPANITCHAROEN, M.; MARTIN, G.P. An in vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.225 n.1-2, p. 113-121, 2001.

BRUMMER, R.; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 152, 89, 1999.

BUHSE, L.; KOLINSKI, R.; WESTENBERGER, B.; *et al.* Topical drug classification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295 n.13, p. 101-112, 2005.

CALVO, P.; ALONSO M.J.; VILA-JATO, J.L.; ROBINSON, J.R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v. 48, n.11, p.1147-52. 1996.

CASTELLI, F.; SARPIETRO, G.M.; MESSINA C.; LAZZARI A.; ROSA, D.; GIANNETTO, A. Differential scanning calorimetry differences in micronized and unmiconized nimesulide uptake processes in biomembrane models. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 19, n.4, p. 237-43, 2003.

CEVC, G.; BLUME, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1514, p. 191-205, 2001.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.56, p. 675-671, 2004.

CIFTCI, K.; KAS, H. S.; HINCAL, A.A.; ERCAN, T.M.; GÜVEN, O.; RUACAN, S. In vitro and in vivo evaluation of PLAGA (50/50) microspheres containing 5-fluorouracil prepared by a solvent evaporation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v.131, p. 73-82, 1995.

CONTRERAS, M.J.F., DIÉGUEZ A.R., SORIANO M.M.J. Rheological characterization of hydroalcoholic gels–15% ethanol–of Carbopol® Ultrez™ 10. **Il Fármaco**, 56: 437 – 441, 2001.

CONTRERAS, M.J.F.; SORIANO M.M.J.; DIÉGUEZ A.R. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, p. 134-145, 2005.

CORDERO, J.A.; ALARCON, L.; ESCRIBANO, E.; OBACH, R.; DOMENECH, J. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 86, p. 503-508, 1997.

CORNWELL, P.A.; BARRY, B.W. Effects of penetration enhancer treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, p. 101-112, 1995.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 41, n.1, p. 2-13, 1995.

CROSS, S.E.; PUGH, W.J.; HADGRAFT, J.; ROBERTS, M.S. Probing the effect of Vehicles on topical Delivery: Understanding the Basic Relationship Between Solvent and Solute Penetration Using Silicone Membranes. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n.7, p. 999-1005, 2001.

CRUZ, L.; SOARES, L.U; COSTA, T.D; MEZZALIRA, G; DA SILVEIRA, N.P;

GUTERRES, S.S; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal Pharmaceutics**, v. 313, n.1-2, p.198-205, 2006.

CURDY, C.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GUY, R.H. Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 73-79, 2001.

DAVIS, R.; BROGDEN, R.N. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs** v. 48, Issue 3, p. 431-454, 1994.

DE PAULA I.C.; ORTEGA G.G.; BASSANI V.L.; PETROVICK P.R. Development of Ointment Formulations Prepared with *Achyrocline satureioides* Spray-Dried Extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.3, p. 235 – 241, 1998.

DHAON, B.K.; FAROOQUE, M-F.; SHARMA, D.R.; BHUTANI, S. Open labeled clinical evaluation of local application of nimesulide transdermal gel in painful musculoskeletal conditions. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 32, n.2, p. 75-78, 1998.

DHAON, B.K.; SINGH, O.P.; GUPTA, S.P.; MAINI, L.; SHARMA, D.K., BHUTANI, S. Efficacy and safety of nimesulide transdermal gel versus diclofenac and piroxicam gel in patients with acute musculoskeletal condition. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 34, n.4, p. 288-292, 2000.

DOLIWA, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam . **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, n.1-2, p. 37-44, 2001.

DOLZ, M.; HERRÁEZ, M.; GONZÁLEZ, F.; DÍEZ, O.; DELEGIDO, J.; HERNÁNDEZ, M.J. Flow behaviour of Carbopol®-940 hydrogels. The influence of concentration and agitation time. **Pharmazie**, v. 53, p.126, 1998.

EMBIL PHARMACEUTICAL Co Ltda. Nimesulide containing topical pharmaceutical compositions. **Patent**, PCT/IB 9901460, 2003.

EROS, I.; KONIA, M.; CSOKA, I. Study of the structure of coherent emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n.1-2, p. 75-84, 2003.

ESSA, E.A.; BONNER, M.C.; BARRY, BW. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1481-1490, 2002.

FALLAVENA, P.R.B.; SCHAPOVAL, E.E.S. pK_a determination of nimesulide in

methanol-water mixtures by potentiometric titrations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 109-112, 1997.

FALLAVENA, P.R. **Estudo da constante de dissociação e da estabilidade térmica e fotoquímica da nimesulida**, 1998. 112 p., Tese (Doutorado em Farmácia) – Curso de Pós Graduação Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

FANG, J.; SUNG, K.C.; LIN, H.; FANG, C. Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, p. 83-92, 1999.

FERREIRA, H.; LUCIO, M.; DE CASTRO, B.; GAMEIRO, P.; LIMA, R.S. Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: an espectrophotometric and fluorescen study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n.2, p.293-8, 2003.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Procédé de préparation des systèmes collidaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n.12, p.417-425, 2000.

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

GALLAGHER, D.J.; TROTET, L.; HEARD, C.M. Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness. **International Journal of Pharmaceutics**, v.268, p. 37-45, 2003.

GARG A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of Semisolid Formulations. **Pharmaceutical Technology**, 26, n.9, p. 84 – 105, 2002.

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

GASPERLIN, M.; TUSAR, L.; TUSAR, M.; KRISTL, J.; SMID-KORBAR, J. Viscosity prediction of lipophilic semisolid emulsion systems by neural network modeling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, p.243, 1998.

GENNARO, A.R. (Ed.) **Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy**, SCHOTT, H.; ed. Philadelphia, 2000. 2077 p.

GIULIANO, F.; FERRAZ, J.G.P.; PEREIRA, R.; NUCCI, G.; WARNER, T.D.

Cyclooxygenase selectivity of non-steroid anti-inflammatory drugs in humans: ex vivo evaluation. **European Journal of Pharmacology**, v. 426, Issues 1- 2, p. 95-103, 2001.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, M.F. Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 9, p. 1-7, 1999.

GOOSEN, C.; PLESSIS, J.; MÜLLER, D.G.; RENSBURG, L.F. Correlation between physicochemical characteristics, pharmacokinetic properties and transdermal absorption of NSAID's. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 203-209, 1998.

GÜNGÖR, S.; BERGISADI, N. *In vitro* release studies on topical gel formulations of nimesulide. **Pharmazie**, v. 58, p. 155 – 156, 2003.

GUPTA, P.; GARG, S.; Recent advances in semisolid dosage forms for dermatological application. **Pharmaceutical Technology**, 26 v. n.3, p. 144 – 162, 2002.

GUPTA, S.K.; PRAKASH, J.; AWOR, L.; JOSHI, S.; VELPANDIAN, T.; SENGUPTA, S. Anti-inflammatory activity of topical nimesulide gel in various experimental models. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society**, v. 45, Issue 12 p. 590-592, 1996.

GÜROL, Z.; HEKIMOĞLU, S.; DEMIRDAMAR, R.; SUMNU, M. Percutaneous absorption of ketoprofen I. In vitro release and percutaneous absorption of ketoprofen from different ointment bases. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, p. 205-212, 1995.

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

HADGRAFT, J.; PECK, J.; WILLIAMS, D.G.; PUGH, W.J.; ALLAN, G. Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 17-25, 1996.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HEARD, C.M.; MONK, B.V.; MODLEY, A.J. Binding of primaquine to epidermal membranes and keratin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, p. 237-244, 2003.

HUANG, Y.; WU, P.; KO, H.; TSAI, Y. Crodamom oil as a skin permeation

enhancer for indomethacin, piroxicam and diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 126, p. 111-117, 1995.

IVENS, U. I.; STEINKJER, B.; SERUP, J.; TETENS, V. Ointment is evenly spread on the skin, in contrast to creams and solutions. **British Journal Dermatology**, v.145, p.264, 2001.

JAGER, A.D.; ELLIS, H.; HUNDT, H.K.L.; SWART, K.J.; HUNDT, A.F. High-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of piroxicam in human plasma and tissues. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 729, p. 183-189, 1999.

JALÓN, E.G., BLANCO-PRÍETO M.J., YGARTUA, P., SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**, v.75, p.191-197, 2001a.

JALÓN, E.G.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 181-184, 2001b.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 115-126, 2000a.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; Gohla, S. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 49, p. 211-218, 2000b.

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

JOSEPH, N. J.; LAKSHMI, S.; JAYAKRISHNAN, A. A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 71-19, 2002.

KALIA, N.Y.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n.2-3, p. 159-172, 2001.

KAN, P.; CHEN, Z; KUNG, R; LEE, C.; CHU, I. Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 15, n.2, p.117-125, 1999.

KANIKKANNAN, N.; JACKSON, T.; SHAIK, S.M.; SINGH, M. Evaluation of skin sensitization potential of melatonin and nimesulide by murine local lymph node

assay. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 14, n.3, p. 217-220, 2001.

KATTAN, E.; ASBILL, C.S.; HAIDAR, S. Transdermal testing: practical aspects and methods. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v.3, n.12, p. 426-430, 2000.

KIM, S.Y.; LEE, M.Y. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly (ethylene glycol) and poly (ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers. **Biomaterials**, v.22, p.1697-1704, 2001.

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

KONNO, T.; KURITA, K.; IWASAKI, Y.; NAKABAYASHI, N.; ISHIHARA, K. Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxy ethyl phosphorylcholine polymer. **Biomaterials**, v.22, p. 1883-1889, 2001.

KORHONEN, M.; NISKANEN, H.; KIESVAARA, J.; YLIRUUSI, J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 197, p. 143, 2000.

KREUTER Nanoparticles. **Journal Colloidal drug delivery systems**, Marcel Dekker, New York, NY v. 66, p. 314-315, 1994.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANG, J.L.; Reologia Farmacêutica in **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**; WOOD, J. H. ed.; Fundação Galauste Gulbenkian Lisboa, 2001.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; PÉREZ, M.H.; LEHR, M.C.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v.184, p. 97-105, 1999.

LARDY, F.; VENNAT, B.; POUGET, M.P.; POURRAT, A. Functionalization of Hydrocolloids: Principal Component Analysis Applied to the Study of correlations Between Parameters Describing the Consistency of Hydrogels **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 26, n.7, p. 715 – 721, 2000.

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

LEON, M.J.; LUCERO, M.J.; MILLÁN, R.A comparative study of the extensibility

and bio-availability of topical preparations of glycol salicylate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, p. 737. 1991.

LIM, S.; KIM, C.; Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, n.1-2, p. 135-146, 2002.

LIMA, E.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. **Ver. Bras. Med.** São Paulo v. 51, p. 585-90, 1994.

LIMA, E. M. Reologia. **Fármacos & Medicamentos**, v. 4, n.20, 2000.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, p. 9-12, 2001.

LOPEZ, R.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2000(1), p. 127-132, 2000.

LUCERO, M.J.; VIGO, J.; LÉON, M.J. A study of shear and compression deformations on hydrophilic gels of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.106, p.125, 1994a.

LUCERO, M.J.; VIGO, J.; LÉON, M.J. A study of shear and compression deformations on hydrophilic gels of α -tocopherol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, p. 261, 1994b.

LUCERO, M.J.; VIGO, J.; LÉON, M.J. The influence of antioxidants on spreadability of α -tocopherol gels. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p. 2315, 1994c.

MAGDASSI, S. Delivery Systems in cosmetics. **Colloids and Surfaces**, v. 123-124, p. 671-679, 1997.

MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 63-74, 2000.

MAIA, C.S.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n.1-2, p. 165-167, 2000.

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

32, p.97, 2003.

MARRIOTT, C. Reologia in **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, Aulton Michael; 2^a ed., Artmed: São Paulo, 2005. 677 p.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in Physical Pharmacy**; 4th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 622 p.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n.2-3, p. 165-196, 2001.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticles and microemulsion for topical delivery of triptolide **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 56, p. 189-196, 2003.

MERIANI, F.; COCEANI, N.; SIROTTI, C.; VOINOVICH, D.; GRASSI, M. Characterization of a quaternary liquid system improving the bioavailability of poorly water soluble drugs. **Journal Colloid Interface Science**, v. 263, n.2, p. 590-6, 2003.

MICHEL, C.; PURMANN, T.; MENTRUP, E.; SEILLER, E.; KREUTER, J. Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 84, p. 93-105, 1992.

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.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. 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.

MOHAMMAD T.I; RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1192, 2004.

MONACO, J.P. **Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intra-bucal: Avaliação in vitro da liberação de nimesulida**, 2000. 143 p. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, SP.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v.19, p. 489-501, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of**

Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals, v. 52, p. 103-112, 2001.

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C., MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceuticals Biopharmaceuticals**, v. 45, p. 149-155, 1998.

MÜLLER, C.R.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DE LUCCA FREITAS L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, 56, 864 – 867, 2001.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (NPLS) for controlled drug delivery – a review of the state of the art **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54 Suppl. (1), p. S131-S155, 2002.

NAGOJI, D.E.V; PANDA, J.; RAO, S.S.; PATRO, S.S. Determination of nimesulide in dosage formulations by reverse phase high performance liquid chromatography. **Asian Journal of Chemistry**, 14, n.1, p. 339-343, 2002.

NALLURI, B.N.; CHOWDAY, K.P., MURTHY K.V.; HAYMAN, A.R.; BECKER Physicochemical characterization and dissolution properties of nimesulide-cyclodextrin binary systems. **AAPS PharmSciTech.**, v.(4)1: E2, 2003.

NANGIA, A.; PATIL, S.; BERNER, B.; BOMAN, A.; MAIBACH, H. In vitro measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, p. 33-40, 1998.

NETZ, P.A.; GEORGE, G.O. Reologia in **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Art.Med , ed., 2002. 299 p.

NISHIHATA, T.; KAMADA, A.; SAKAI, K.; TAKAHAHI, K.; MATSUMOTO, K.; SHINOZAKI, K.; TABAT, Y.; KEIGAMI, M.; MIYAGI, T.; TATSUMI, N. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 46, p. 1-7, 1988.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. Harper & Row do Brasil, São Paulo, 1982. 490 p.

OWEN, D.; PETERS, J. KATZ, D. Rheological properties of contraceptive gels **Contraception**, v. 62, p.321, 2000.

PANDEY, R.K.; GANGA, S.; JAYASWAL, S.B.; SINGH, J. Transdermal transport of piroxicam from ointment bases. **Pharmazie**, v. 47, p. 800-801, 1992.

PATRAVALE, V.B.; AMBARKHANE, A.V. Study of solid lipid nanoparticles with respect too particle size distribution and drug loading. **Pharmazie**, v. 58, n.6, p.392-5, 2003.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; SCHUBERT, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 139 – 149, 2001.

PELLET, M.A.; ROBERTS, M.S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 91-98, 1997a.

PELLET, M.A.; CASTELLANO, S.; HADGRAFT, J.; DAVIS, A.F. The penetration of supersaturated solutions of piroxicam across silicone membranes and human skin in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 46, p. 205-214, 1997b.

PENZES, T; CSOKA, I; EROS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels **Rheologica Acta**, v. 43, p. 457, 2004.

PIEL, G.; PIROTTE, B.; DELNEUVILLE, I.; NEVEN, P.; LLABRES, G.; DELARGE, J.; DELATTRE, I. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n.4, p. 475-479, 1997.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-168, 2000.

PRISTA, L.N.; Formas farmacêuticas obtidas por operações complexas ou múltiplas in **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 2, 1995.

PUGLIA, C.; BONINA, F.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; RICCI, M. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepan and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 79-87, 2001.

RABASSEDA, X. Safety profile of nimesulide: ten years of clinical experience. **Drugs of today**, v.33, n.1, p. 41-50, 1997.

RAMIREZ, A.; FRESNO, M.J.; JIMENEZ, M.M.; SELLES, E. Rheological study of Carbopol® Ultrez™ 10 hydroalcoholic gels, I: Flow and thixotropic behavior as a function of pH and polymer concentration. **Pharmazie**, v. 54, p.444, 1999.

REDDY, N.; UDUPA, N. Formulation and evaluation of oral and transdermal preparations of flurbiprofen and piroxicam incorporated with different carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 7, p.843-852, 1993.

RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal Cosmetic Science**, v.26, p.47, 2004.

ROVENSKY, J.; SVICK, K.; ISTOK, R.; STANCIKOVA, M. Quantitative assessment of markers of inflammation, arthritis and pain in rats with adjuvant arthritis following the treatment with ibuprofen cream and placebo. **Drugs under experimental and clinical research**, v.29, n.2, 85-90, 2003.

SANDT, J.J.M.; BURGSTEDEN, J.A.; CAGE, S.; *et al.* In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone and benzoic acid: a multi-centre comparison study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 271-181, 2004.

SANTOYO, S.; ARELLANO, A.; YGARTUA, P.; MARTÍN, C. Penetration enhancer effects on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, p. 219-224, 1995.

SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n.2, p. 245-250, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., DE CORDOVA, C.A., CRECZYNSKI-PASA, T.B., GUTERRES, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal Pharmaceutics**, v. 289, n.1-2 p. 209-213, 2005.

SCHRAMM, G.A. **Practical Approach to Rheology and Rheometry**. 2nd, Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe Federal Republic of Germany, 2000. 291 p.

SENGUPTA, S.; VELPANDIAN, T.; KABIR, S.R.; GUPTA, S.K. Analgesic efficacy and pharmacokinetics of topical nimesulide gel in healthy human

volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac and placebo. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n.7, p. 541-547, 1998.

SHAHIWALA, A. MISRA, A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. **Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science** v. 5, n.3, p. 220-225, 2002.

SHAWESH, A.M.; KAUKONEN, A.M.; KALLIOINEN, S.; ANTIKAINEN, O.; YLIRUUSI, J. Development of indomethacin Carbopol ETD 2001 gels and the influence of storage time and temperature on their stability. **Pharmazie**, v. 58, 130 – 135, 2003.

SHIN, S.; WEON, C.; CHO, C.; OH, I. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the polaxamer gel in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 213-218, 2000.

SINGH, P.; ROBERTS, M.S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, p. 144-151, 1994.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

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

SZNITOWSKA, M.; STANISLAW, J.; BACZEK, A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 327-335, 2001.

TAMURA, T; TAKAYAMA, K.; SATOH, H.; TANNO, K.; NAGAI, T. Evaluation of oil/water-type cyclosporine gel ointment with commercially available oral solution. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, p. 285, 1997.

TAUBER, U. Drug metabolism in the skin: advantages and disadvantages, in: HADGRAFT, J.R.H. Guy (Eds.), **Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives**, Marcel Dekker, New York, p. 99–112, 1989.

TAYLOR, C.R.; STERN, R.S.; LEYDEN, J.J.; GILCHREST, B.A. Photoageing/photodamage and photoprotection. **Journal of American Acad. Dermatology** v.22, p. 1–15, 1990.

TING, W.W.; VEST, C.D.; SONTHEIMER, R.D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 538-547, 2004.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 7-21, 1998.

TSAI, Y.; HSU, L.; NAITO, S. Percutaneous absorption of piroxicam from ointment bases in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, p. 61-78, 1985.

TUNÇAY, M.; ÇALI, S.; KA, H.S.; ERCAN, M.T.; PEKSOY HINCAL, A. A. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, p. 179-188, 2000.

TURUNEN, T.M.; URTII, A. Penetration enhances in transdermal drug delivery. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 101, p. 3-10, 1992.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, Validation of Compendial Methods, 29th ed. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2006.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A.; POURRAT, H. A dosage form for procyanidins gels based on cellulose derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, n.15, p. 2083, 1991.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A. Procyanidin gels based on cellulose and carragenan derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.18, n.14, p. 1535 – 1548, 1992.

VENTER, J.P.; MÜLLER, D.G.; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v.13, p.169-177, 2001.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n.1-2, p. 141-151, 2003a.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n.3, p. 271-277, 2003b.

VERMA, D.D.; FAHR, A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 55-66, 2004.

WAGNER, H.; KOSTKA K. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v.75, p. 283-295, 2001.

WELIN-BERGER, K.; NEELISSEN, J.A.M.; BERGENSTAHL, B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v.13, p. 309 – 318, 2001.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J.; **Cosmetologia de Harry**, Diaz de Santos, S.A.: Madrid, 1990. 1039 p.

WILKINSON, S.C., MAAS, W.J.M., NIELSEN, J.B., GREAVES, L.C., VAN DE SANDT, J.J., WILLIAMS, F.M. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 25, n.1-9, 2006.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 23, p. 233-243, 2001.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n.3, p. 225-233, 2002a.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. The development of an improved carrier system for sunscreen formulations based on crystalline lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n.21, p. 373-375, 2002b.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 377-379, 2002c.

WOOLFSON, A.D.; MALCOLM, R.K.; CAMPBELL, K.; JONES, D.S; RUSSELL, J.A. J. Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual drug systems for percutaneous delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 395, 2000.

YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pigs in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 38, p. 267-274, 1996.

YOKOYAMA, M.; OKANO, T. Targetable drug carriers: present status and a future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p. 77-80, 1996.

BIOGRAFIA E PRODUÇÃO CIENTÍFICA

DADOS PESSOAIS

Nome: Marta Palma Alves

Filiação: João Guedes Palma e Maria Terezinha Knoll Palma

Nascimento: 08/01/1963, Passo Fundo, RS

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1982-1985 Curso de Farmácia - Modalidade Farmacêutico: Universidade Federal de Santa Maria

1985-1986 Curso de Farmácia - Modalidade Farmacêutico Bioquímico: Universidade Federal de Santa Maria

1986-1987 Curso de Farmácia - Modalidade Farmacêutico Industrial: Universidade Federal de Santa Maria

1992-1996 Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas: Universidade Federal de Santa Maria

Dissertação: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas. Influência de promotores de absorção na permeação transdérmica de piroxicam.

2002-2006 Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PRODUÇÃO INTELECTUAL RELACIONADA À TESE

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. 900-4, 2005.

ALVES, P.M; FLORES, P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Hydrophilic gels containing nanocarriers: Mathematical modeling and rheological and occlusive properties. In: SKIN AND FORMULATION 2ND SYMPOSIUM, Versailles - France, 2006.

ALVES, P.M; POHLMANN A.R; GUTERRES, S.S. Penetration of hydrophilic gels containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion. In: SKIN AND FORMULATION 2ND SYMPOSIUM, Versailles - France, 2006.

ALVES, P.M; POHLMANN A.R; GUTERRES S.S. Semisolid topical formulations containing nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion of nimesulide: Development and physico-chemical characterization. In: I MOSTRA DE NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA DA UFRGS, Porto Alegre, 2006.

PARECERES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro*.

Doutoranda: Marta Palma Alves

P A R E C E R

O trabalho apresentado pela doutoranda teve por objetivo principal o desenvolvimento, caracterização físico-química e da permeação cutânea de nanoestruturas contendo o antiinflamatório nimesulida, dispersas em formas farmacêuticas plásticas. O tema abordado é relevante e original, sendo de grande interesse no campo de desenvolvimento de nanoestruturas de uso tópico.

A tese está dividida em dois diferentes capítulos. Estes estão apresentados na forma de publicações ou artigos em fase de redação, que tratam desde a formulação e caracterização físico-química dos sistemas obtidos (capítulo 1) até a investigação da permeação *in vitro* da nimesulida, utilizando células de difusão de Franz (capítulo 2). Os resultados estão apresentados de forma ordenada e discutidos com base em uma literatura atual. No seu conjunto, a tese representa uma relevante contribuição ao desenvolvimento de formas farmacêuticas nanoestruturadas de uso tópico contendo nimesulida.

Face ao exposto, considero a tese aprovada e sou de parecer favorável à concessão do título de doutor em Ciências Farmacêuticas à candidata MARTA PALMA ALVES.

Porto Alegre, 22 de setembro de 2006.


Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Faculdade de Farmácia/UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea In vitro.

Doutoranda: MARTA PALMA ALVES

PARECER

A associação de nimesulida, anti-inflamatório não esteróide, à nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões, a incorporação desses nanocarreadores em géis hidrofílicos, na caracterização e estudos de permeação in vitro, foram os principais objetivos da presente tese. A relevância do tema é demonstrada pela inexistência de registro de associação de nimesulida a sistemas nanotecnológicos, até o momento.

O trabalho apresenta plano bem adequado, havendo coerência entre objetivos, métodos e conclusões. Destaca-se a apresentação do tema sob forma de artigos científicos em que são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos realizados, como artigos de revisão, necessários à compreensão do tema.

Considerando o exposto, o parecer é favorável à aprovação do tema e à atribuição do título de doutor em Ciências Farmacêuticas à candidata Marta Palma Alves.

Simone Gonçalves Cardoso

Profa. Dr. Simone Gonçalves Cardoso
(Universidade Federal de Santa Maria)

Porto Alegre, 22 de setembro 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea In vitro.

Doutoranda: MARTA PALMA ALVES

PARECER

Este trabalho está muito bem apresentado com poucos erros gramaticais e digitação. A Tese está situada em um Tema muito relevante para as áreas de Farmácia e Nano-ciência em geral. O texto é apresentado de forma sucinta por meio de artigos a serem publicados ou já publicados. São apresentados dois artigos de revisão que serão de excelente aplicação para novos pesquisadores da área. Portanto, a Tese apresenta objetivamente o desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico fazendo uso de nimesulida associada a nanocápsulas. Considero a Tese aprovada.

Solange Binotto Eagan
Profa. Dr. Solange Binotto Eagan
(Centro Universitário Franciscano)

Porto Alegre, 22 de Setembro 2006.

[versão 28JAN2005]

