



**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO**  
**ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS**  
Curso de Mestrado em Nanociências

**QUÉLI FERNANDES LENZ**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE  
DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE  
NIMESULIDA**

Santa Maria, RS  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**QUÉLI FERNANDES LENZ**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE  
DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE  
NIMESULIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências do Centro Universitário Franciscano de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marta Palma Alves

Santa Maria, RS  
2009



*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Rubem e Ilca, e ao meu esposo Dalton.*

## *Agradecimentos*

*A Deus, Ser Supremo, que sempre esteve comigo durante esta jornada, por toda a força que me concedeu, por estar sempre presente e, principalmente, por levantar-me quando, muitas vezes, tropecei, agradeço por mais esta vitória.*

*À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marta Palma Alves, excelente profissional, íntegra e dedicada, o meu reconhecimento e gratidão pelas horas que, incansavelmente, voltou-se ao meu trabalho e a me dar a mão quando algumas vezes fraquejei.*

*Aos meus pais, Rubem e Ilca, pessoas extremamente humanas e sensíveis, seres dotados de luz própria, conselheiros e orientadores, meus heróis e meus ídolos, amigos sempre presentes e insubstituíveis que abriram mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, a quem devo minha vida e cada conquista adquirida, agradeço por mais esta vitória.*

*Aos meus irmãos, Helen e Allan, agradeço por existirem, pelos sorrisos e abraços com que souberam me acalantar.*

*À minha irmã Iomar, minha “Dada”, sempre presente, agradeço por tudo que fez e ainda faz por mim.*

*Ao meu esposo Dalton, meu amor, que soube suportar meus piores momentos, acalmar meus piores medos e me fazer sossegar quando a tensão parecia insuportável, agradeço pela compreensão, pelo carinho e apoio dedicados. Sem ele eu não teria chegado até aqui.*

*Aos meus avós, Branca e Olímpio, que viveram a minha vida comigo, cada medo, cada sonho, cada conquista, agradeço por toda a força e dedicação.*

*Às minhas amigas e colegas de mestrado que caminharam comigo até aqui.*

*A todas aquelas pessoas que, de uma forma ou de outra, estiveram comigo durante essa jornada, o meu eterno agradecimento.*

## RESUMO

Anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) representam uma das classes de fármacos mais comumente usados, sendo frequentemente usados para o tratamento de estados inflamatórios agudos e crônicos. A nimesulida, fármaco pertencente à classe dos AINEs, é comumente utilizada em processos inflamatórios, tais como: inflamações do trato respiratório, da cavidade oral e em situações inflamatórias associadas com tendinite, sinovite e artrite reumatóide. Sabe-se, porém, que a administração oral da nimesulida pode causar inúmeros efeitos adversos, incluindo desde perturbações gastrointestinais até toxicidade hepática e renal. Em virtude disso, a administração tópica do fármaco constitui uma alternativa a esses problemas. Além da utilização dessa via, carreadores como nanopartículas apresentam muitas vantagens para aplicação tópica, dentre elas, a liberação sustentada, a qual se torna importante para o suprimento de fármaco na pele, por um período prolongado de tempo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante de um gel tópico contendo nimesulida nanoencapsulada utilizando modelos experimentais, bem como a realização de análises comparativas com relação à atividade da nimesulida na forma livre e na forma nanoestruturada. Para determinação da atividade anti-inflamatória, tanto aguda quanto crônica, foram usados ratos machos Wistar (200 e 250g). Para avaliação de inflamação aguda foram usados os modelos de indução de edema de pata por carragenina e indução de artrite aguda por *Adjuvante de Freud*. Os modelos de inflamação crônica *in vivo* utilizados foram indução de artrite crônica por *Adjuvante de Freud*, indução de formação de tecido granulomatoso por introdução de *pellet* de algodão e cicatrização. A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de captação do radical DPPH e dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) em tecido de lesão dorsal (modelo de cicatrização). As nanocápsulas de nimesulida (1,5 mg/ml) foram preparadas através do método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (Fessi, et al, 1998), desenvolvidas e caracterizadas por Alves e colaboradores (2005). A partir dos dados obtidos nos modelos de inflamação aguda, não foi observada diferença significativa entre a atividade da nimesulida em nanocápsulas (GHNCN) e na forma livre (GHN), onde ambas as formulações foram capazes de inibir o processo inflamatório. Por outro lado, nos modelos de inflamação crônica a formulação contendo o fármaco nanoestruturado demonstrou uma atividade significativamente maior do que aquela contendo o fármaco livre. No modelo de artrite crônica a atividade anti-inflamatória foi de 81,5%, comparada ao fármaco livre (27,75%). A formulação contendo o fármaco nanoestruturado também foi capaz de inibir a formação de tecido granulomatoso em 36,66% em relação ao fármaco livre, o qual inibiu apenas 2,82%. No ensaio de cicatrização, o fármaco livre (GHN) apresentou uma retração do tecido de 38,82%; o nanoestruturado, de 19,35%; e o controle de 10,5%. Através da técnica do DPPH não foi possível observar diferença significativa entre as formulações (GHNCN e GHN), entretanto ambas demonstraram excelente ação antioxidante. Embora não estatisticamente diferentes, foi possível observar uma ação mais acentuada na formulação com a nimesulida em nanocápsulas em todas as concentrações testadas. Na determinação de *TBARS*, os níveis de malondialdeído (MDA) para o fármaco livre e nanoestruturado foram, respectivamente, 730,20 e 571,33 nmol MDA/g tecido, comparados com o grupo controle (1.457 nmol MDA/g tecido). A partir dos dados obtidos, foi possível demonstrar que a nimesulida nanoestruturada incorporada em hidrogel apresenta atividades anti-inflamatória e antioxidante adequadas, constituindo-se numa alternativa para tratamentos de processos inflamatórios através da via tópica de administração.

**Palavras-chave:** nimesulida; inflamação; peroxidação lipídica; nanocápsulas; via tópica.

## ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatories (NSAIDs) represent one of the most commonly used classes of drugs, they are often applied in the treatment of chronic or acute inflammatory processes. Nimesulide, a drug which belongs to the NSAIDs, is usually applied in inflammatory processes, such as: inflammation of lower respiratory tract, oral cavity and in inflammatory processes associated to tendinitis, synovitis and rheumatoid arthritis. However, it is known that the oral administration of nimesulide might cause several adverse effects, from gastrointestinal disturbances to liver and kidney toxicity. Therefore, the topical administration of the drug is an alternative to these problems. Besides the use of such option, carriers, such as nanoparticles, present many advantages for topic application. Among them, the sustained liberation, which becomes important for the drug supply on the skin during a longer period of time. This work aims at assessing the anti-inflammatory and the antioxidant activity of a topical gel containing nanoencapsulated nimesulide by using experimental models, as well as carrying out comparative analysis related to the nimesulide activity either free or nanostructured. In order to determine the anti-inflammatory activity, either acute or chronic, male rats were used Wistar (200 e 250g). In order to evaluate the acute inflammation, paw edema induced by carrageenan and acute arthritis inductions by Freud Adjuvant were used. The chronic inflammation models *in vivo* applied were induction of chronic arthritis by Freud Adjuvant, induction of formation of granulomatous tissue by cotton pellet and healing. The antioxidant activity was assessed through radical capturing method DPPH and dosage of substances reactive to the tiobarbituric acid (*TBARS*) in dorsal damaged tissue (healing model). The nanocapsules of nimesulide (1,5 mg/ml) were prepared through the method of nanoprecipitation of preformed polymer (Fessi, et al. 1998), developed and characterized by Alves and collaborators (2005). From the obtained data in the acute inflammation models, no significative difference was observed between the activity of the nimesulide in nanocapsules (GHNCN) and in the free form (GHN), where both the formulations were able to inhibit the inflammatory process. On the other hand, in the chronic inflammation the formulation containing the nonostructured drug showed a better activity than that showed by the free drug. In the chronic arthritis model the anti-inflammatory activity was 81,5%, compared to the free drug (27,75%). The formulation containing the nanostructured drug was also able to inhibit the formation of granulomatous tissue in 36,66% compared to the free drug, which inhibited just 2,82. In the healing trial the free drug (GHN) presented an tissue retraction of 38,82%, the nanostructured of 19,35% and the control of 10,5%. Through the DPPH technique, it was not possible to observe any significant difference between the formulations (GHNCN e GHN), however, both demonstrated excellent antioxidant action. Although not statistically different, it was possible to observe a higher action in the formulation containing nimesulide in nanocapsules in all tested concentrations. In the determination of *TBARS* malondialdehyde levels (MDA) for the free and the nanostructured drugs were respectively 730,20 e 571,33 nmol MDA/g tissue, compared to the control group (1.457 nmol MDA/g tissue). From the obtained data, it was possible to demonstrate that the nanostructured nimesulide incorporated to the hydro gel presents adequate anti-inflammatory and antioxidant activities, becoming an alternative to the treatment of inflammatory processes through topical administration.

**Keywords:** nimesulide; inflammation; lipidic peroxidation; nanocapsules; topical use.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de prostanoídes (prostaglandinas e tromboxanos) a partir do metabolismo do ácido aracdônico .....	18
Figura 2 – Produção de radicais livres .....	21
Figura 3 - Estrutura química da nimesulida (4-nitro-2-fenoxi-trifluorometano-sulfonamida). 30	
Figura 4 – Estrutura básica da pele.....	41
Figura 5 - Estrutura da epiderme .....	42
Figura 6 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre o edema de pata após 3h da injeção de carragenina.....	64
Figura 7 – A) Determinação do volume da pata através de pletismografia; B) Edema de pata em rato tratado com gel contendo nanocápsulas vazias (GHNCV); C) Edema de pata em rato tratado como a formulação contendo nimesulida na forma livre (GHN); D) Edema de pata em rato tratado com a formulação contendo nimesulida nanoestruturada (GHNCN) .....	65
Figura 8 - A) Artrite aguda em rato tratado com gel contendo nimesulida na forma nanoestruturada (GHNCN); B) Artrite aguda em rato tratado com gel contendo nimesulida na forma livre (GHN).....	67
Figura 9 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre a artrite induzida, após 18h da injeção do <i>Adjuvante de Freud</i> .....	68
Figura 10 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre a artrite crônica, após 14 dias da injeção do <i>Adjuvante de Freud</i> .....	69
Figura 11 – Granulomas removidos dos animais do grupo tratado com gel contendo nanocápsulas de nimesulida (GHNCN), no sétimo dia do experimento e secos em estufa a 40°C .....	71
Figura 12 – A) Abertura da incisão dorsal para implante do <i>pellet</i> de algodão; B) Incisão aberta; C) <i>Pellet</i> introduzido e incisão fechada por sutura cirúrgica.....	72
Figura 13 – Efeito dos géis de nimesulida sobre a formação do granuloma, após 7 dias da introdução do <i>pellet</i> de algodão.....	73
Figura 14 – Retração do tecido em torno da lesão no modelo de cicatrização, no 3º dia em rato do grupo tratado com nimesulida nanoestruturada (GHNCN).....	75

Figura 15 – Médias das áreas das lesões no 1º, 3º, 5º e 7º dia nos grupos tratados com as diferentes formulações contendo nimesulida (GHN e GHNCN) e no grupo controle (GHNCV) .....	77
Figura 16 - Retração da lesão induzida no modelo de cicatrização produzida pela nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) e incorporada em formulações semissólidas.....	78
Figura 17 – Atividade antioxidante <i>in vitro</i> da nimesulida (DPPH) em diferentes concentrações para as formulações semissólidas contendo a nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) .....	80
Figura 18 – Atividade antioxidante <i>ex vivo</i> da nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), em relação ao controle (GHNCV).....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Componentes das formulações dos géis hidrofílicos contendo nimesulida na forma livre (GHN), na forma nanoencapsulada (GHNCN) e contendo nanocápsulas vazias (GHNCV) .....	57
TABELA 2 – Características físico-químicas da suspensão de nanocápsulas contendo nimesulida (NC/NM).....	62
TABELA 3 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	63
TABELA 4 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), no modelo de indução de artrite aguda por <i>Adjuvante de Freud</i> .....	68
TABELA 5 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), no modelo de indução de artrite crônica por <i>Adjuvante de Freud</i> .....	69
TABELA 6 - Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), no modelo de indução de granuloma por <i>pellet</i> de algodão.....	73
TABELA 7 – Atividade da nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), incorporada em formulações semissólidas sobre a retração do tecido em torno da lesão .....	76
TABELA 8 – Atividade antioxidante da nimesulida na forma nanoestruturada (GHNCN) e na forma livre (GHN), na técnica do DPPH.....	80

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 INFLAMAÇÃO .....	26
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
2.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES (AINES).....	25
2.4 NIMESULIDA .....	30
2.5 SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	34
2.6 VIA TÓPICA PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS.....	47
2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i> .....	47
2.7.1 Modelo <i>in vivo</i> de edema de pata induzido por carragenina .....	47
2.7.2 Modelo <i>in vivo</i> de indução de artrite por <i>Adjuvante de Freud</i> .....	48
2.7.3 Modelo <i>in vivo</i> de indução da formação de tecido granulomatoso .....	48
2.7.4 Modelo <i>in vivo</i> de cicatrização .....	49
2.8 MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> .....	51
2.8.1 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> através da técnica de captação do radical 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH).....	51
2.9 MODELOS EXPERIMENTAIS <i>EX VIVO</i> .....	52
2.9.1 Determinação da atividade antioxidante <i>ex vivo</i> através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( <i>TBARS</i> ) .....	52
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	54
3.1.1 Matérias-primas, reagentes, solventes e outras substâncias .....	54
3.1.2 Equipamentos e utensílios .....	55
3.2 MÉTODOS.....	55
3.2.1 Preparação das nanopartículas.....	55
3.2.1.1 Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas contendo nimesulida ...	56
3.2.1.1.1 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão .....	56
3.2.1.1.2 Potencial Zeta .....	56
3.2.1.2 Preparação das formulações semissólidas .....	56
3.2.2 Estudos <i>in vivo</i> .....	57

3.2.2.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina .....	58
3.2.2.2 Modelo de artrite induzida por <i>Adjuvante de Freud</i> .....	58
3.2.2.3 Modelo de indução de formação de tecido granulomatoso .....	59
3.2.2.4 Modelo de cicatrização .....	59
3.2.3 Estudos <i>ex vivo</i> .....	60
3.2.3.1 Atividade antioxidante ( <i>TBARS</i> ) .....	60
3.2.4 Estudos <i>in vitro</i> .....	60
3.2.4.1 Atividade antioxidante ( <i>DPPH</i> ).....	61
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
4.1 FORMULAÇÕES .....	62
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	62
4.2.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	63
4.2.2 Indução de artrite por <i>Adjuvante de Freud</i> .....	66
4.2.3 Formação de tecido granulomatoso .....	71
4.2.4 Cicatrização .....	74
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	79
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) representam uma das classes de fármacos mais comumente usados em processos inflamatórios, apresentando uma boa atividade terapêutica (EICKHOFF *et al*, 1996). Essa classe de fármacos possui atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética, sendo frequentemente usada para o tratamento de estados inflamatórios agudos e crônicos. A maioria dos AINEs são considerados seguros, mas podem causar vários efeitos colaterais em uma fração significativa dos pacientes tratados por via oral, incluindo irritação da mucosa gástrica, toxicidade hepática e renal (KONTOGIORGIS *et al*, 2002).

Os AINEs são amplamente usados por idosos no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite e outras condições inflamatórias crônicas. Tem sido estimado que aproximadamente 75 milhões de prescrições médicas sejam de AINEs, e que aproximadamente 30 a 50 milhões de americanos usam esses fármacos regularmente (BANSAL *et al*, 2007). Nos Estados Unidos, mais de 70 milhões de AINEs são prescritos, e mais de 30 bilhões de comprimidos de venda livre são comercializados anualmente. No Brasil, cerca de 80 milhões de pessoas fazem uso de automedicação, sendo que os AINEs estão entre os mais utilizados pela população (SAKATA E ISSY, 2008).

A nimesulida, fármaco pertencente à classe dos AINEs, é comumente utilizada em processos inflamatórios agudos e/ou crônicos, tais como: inflamações do trato respiratório, da cavidade oral e em situações inflamatórias associadas com tendinite, sinovite e artrite reumatóide. Porém sabe-se que a administração oral da nimesulida pode causar inúmeros efeitos adversos, incluindo desde perturbações gastrointestinais até toxicidade hepática e renal (TRAVERSA *et al*, 2003; WHITTLE; 2003). Além da ação anti-inflamatória, a nimesulida apresenta, ainda, atividade antioxidante. Para os AINEs essa ação é considerada de grande interesse, pois a produção de radicais livres, além de contribuir na inflamação e dor pode causar danos aos tecidos (VANE *et al*, 1998).

Estudos realizados com animais de laboratório sugerem que lesões gastrointestinais resultantes da administração oral de AINEs podem depender de dois mecanismos diferentes: uma ação local exercida pelo contato com a mucosa gástrica e uma ação generalizada (sistêmica) do fármaco. Os danos gástricos induzidos por AINEs ocorrem como resultado de mediadores ácidos diretos e indiretos, seguidos, simultaneamente, por efeitos sistêmicos deletérios como consequência à inibição das prostaglandinas (EICKHOFF *et al*, 1995). A propensão dos AINEs em produzir danos gastrointestinais e hepáticos não é uniforme quanto à

incidência, à característica ou ao mecanismo aparente de toxicidade (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

Diversas estratégias têm sido usadas para evitar os danos gástricos induzidos por AINEs, incluindo: desenvolvimento e uso de AINEs com baixo potencial tóxico; redução ou eliminação dos agentes que atualmente causam injúrias e intensificação da defesa da mucosa. Porém essas providências não têm demonstrado muito sucesso (EICKHOFF *et al*, 1996). Uma das alternativas propostas é a utilização de carreadores, para que o ativo possa atingir o sítio de ação e seja liberado seletivamente no local alvo (SHAHIWALA *et al*, 2002). A liberação de fármacos através de sistemas nanoestruturados tem mostrado um perfil promissor como solução para essa busca (GODESSART *et al*, 1996; ALVES *et al*, 2007).

A introdução de novos fármacos no mercado, além de requerer inúmeros anos de pesquisa, envolve custos extremamente onerosos. Uma alternativa para contornar os altos custos do desenvolvimento de novos fármacos, bem como para atender os preceitos dos estudos de biodisponibilidade, é o uso de sistemas de liberação controlada de fármacos. Estes sistemas têm permitido o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos ativos antes de serem utilizados na terapêutica (BRUM, 2008).

A partir da década de 90, nas áreas de farmácia e medicina, a nanotecnologia tem causado grande impacto. A aplicação da nanotecnologia para tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos têm sido referência nestas áreas, e sua utilização na área da saúde possibilita inúmeras aplicações, dentre elas, o uso de vários nanomateriais para sistemas de liberação de fármacos e de DNA. Essas possibilidades têm chamado muito a atenção de pesquisadores. Diversos materiais nanoestruturados são disponíveis como, diferentes polímeros, nanopartículas de metais, lipossomas, niossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e poliméricas, micelas, *quantum dots*, etc. O uso de carreadores nanoestruturados aumenta a eficiência de muitos fármacos, como os agentes antitumorais, os quais estão entre os primeiros a ter sua eficácia comprovada e bem estabelecida quando em sistemas nanoestruturados (TORCHILIN; 2007).

A utilização da via tópica, através da penetração transdérmica, também tem sido alvo de muitas pesquisas, a fim de evitar os efeitos adversos causados pela administração oral dos AINEs (SHAHIWALA *et al*, 2002). Além da utilização desta via, carreadores como nanopartículas e micropartículas têm sido crescentemente investigados para vetorização de ativos. Os sistemas de liberação preparados com polímeros biodegradáveis, os quais apresentam possibilidade de liberação controlada, aumento da eficiência do fármaco e

redução da toxicidade (GUTERRES *et al*, 1995), apresentam muitas vantagens para aplicação tópica, dentre elas, a liberação sustentada, a qual se torna importante para o suprimento de fármaco na pele por um período prolongado de tempo (GUTERRES *et al*, 1995; ALVES *et al*, 2007; POHLMANN *et al*, 2007).

Esse tipo de sistema nanocarreador pode fazer com que o tempo de ação do fármaco seja aumentado, evitando, assim, as consecutivas administrações (BANSAL *et al*, 2007). O desenvolvimento dessas formulações pode proporcionar a obtenção de sistemas com encapsulamento otimizado do ativo, além de meia-vida longa e diminuição da toxicidade (ZÀVIZOVÁ *et al*, 2006).

Vários estudos têm demonstrado um perfil satisfatório da atividade anti-inflamatória da nimesulida, porém não existem muitos trabalhos realizados com esse fármaco em sistemas nanoestruturados tópicos e testes *in vivo*. Pesquisas com modelos experimentais induzindo a inflamação em roedores e gatos, como edema de pata induzido por carragenina, permitem uma determinação aguçada da relação dose-efeito do fármaco. Além disso, alguns modelos *in vivo* para a pesquisa de AINEs permitem, simultaneamente, a determinação do perfil de atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética desses fármacos (GIRAUDEL *et al*, 2005).

De acordo com o que foi referido anteriormente, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de avaliar a atividade de sistemas nanocarreadores tópicos contendo nimesulida, utilizando modelos experimentais *in vivo*. Assim, considera-se que a via tópica pode representar uma alternativa para evitar os efeitos colaterais induzidos pelos AINEs, principalmente nos casos de doenças crônicas, os quais exigem um tratamento prolongado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante de um gel tópico contendo nimesulida nanoencapsulada utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, bem como a realização de análises comparativas com relação à atividade da nimesulida na forma livre e na forma nanoestruturada.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INFLAMAÇÃO

Segundo Ader e colaboradores (2006), dá-se o nome de inflamação ao conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, sucessivos, ativos e complexos, pelos quais se exterioriza a reação vascular e tissular dos tecidos vivos a qualquer agressão, ou seja, a inflamação é um mecanismo que provoca alterações no sistema vascular, nos componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo. Sendo uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual. Se a reparação (reposição de células e tecidos mortos por células saudáveis) for oriunda do epitélio adjacente é chamada reepitelização; se for do parênquima, regeneração e do estroma é denominada cicatrização (KUMMER E COELHO; 2002).

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido na qual ocorreu a lesão. Diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, com consequentes hiperalgia e/ou alodínia (SAKATA E ISSY, 2008). Os mecanismos dos processos inflamatórios no corpo humano são extremamente complicados e não podem ser atribuídos a um único mediador ou fator. O processo inflamatório possui basicamente duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, dor e edema, enquanto que a fase crônica é caracterizada por proliferação celular (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

A inflamação aguda, com duração relativamente curta, apresenta eventos vasculares como exsudação plasmática e migração de neutrófilos. Esta, refere-se a resposta inicial à lesão tecidual, é mediada pela liberação de mediadores químicos, e em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. A inflamação crônica apresenta duração mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual. (ADER *et al*, 2006).

O resultado da resposta imune pode ser benéfico para o hospedeiro quando permite que os agentes invasores sejam neutralizados e/ou fagocitados. Por outro lado pode ser deletério se resultar em inflamação crônica sem resolução do processo subjacente (GUYTON; 1996).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos irritativos, vasculares, exsudativos, celulares, mediadores derivados de células e resposta imune. Alguns autacóides como a histamina e a serotonina, considerados mediadores de ação rápida (primários), e a plasmina, bradicinina, prostaglandina, tromboxano e leucotrieno, mediadores de ação prolongada (secundários), agem promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (GUYTON E HALL; 1996).

A produção de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos é iniciada com a liberação do ácido aracdônico a partir dos fosfolipídios de membrana, em uma reação catalisada pela fosfolipase A2 (PLA2) (ADER *et al*, 2006). A PLA2 é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas; do fator do complemento C5A nos neutrófilos; da bradicinina nos fibroblastos; das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ROS – espécies reativas de oxigênio, UV-B, agentes químicos, etc.) (GUYTON E HALL; 1996; RAULH; 2008) O ácido aracdônico, uma vez liberado, serve de substrato para as duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase, onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos, e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica, convertido em leucotrienos. (ADER *et al*, 2006).

Pela diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, explica-se a variedade clínica de atuação das PGs, como: papel central na inflamação, coagulação sanguínea, ovulação, metabolismo ósseo, crescimento e desenvolvimento neuronal, cicatrização de feridas, função renal, tônus vascular e respostas imunes (KUMMER E COELHO; 2002).

Na inflamação ocorre aumento de PGs, que são mediadores importantes da hiperalgesia. O efeito hiperalgásico da bradicinina, por exemplo, é potencializado pelas PGs e também pode ser induzido por esses mediadores. As PGs podem provocar hiperalgesia de forma lenta e com longa duração, ou de forma rápida e de curta duração. O envolvimento dessas PGs em diferentes situações clínicas pode facilitar ou não a ação dos anti-inflamatórios (SAKATA E ISSY, 2008).

A ciclo-oxigenase (COX), também chamada prostaglandina H2 sintetase (PGHS), é uma glicoproteína dimérica integral da membrana, encontrada predominantemente no retículo endoplasmático. Nas células dos mamíferos existem pelo menos duas isoformas: A ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Ambas consistem num longo canal estreito, muito hidrofóbico, com uma massa molecular de 71 kDa. Também possuem um sítio ativo semelhante para o seu substrato natural (GRAY *et al*, 2002).

A COX é a enzima que catalisa os dois primeiros passos na biossíntese de prostaglandinas: oxidação do ácido aracdônico ao endoperóxido PGG<sub>2</sub> e sua subsequente redução a PGH<sub>2</sub> (ambos compostos intermediários). A COX apresenta dois sítios catalíticos: o sítio ciclo-oxigenase e o sítio peroxidase. O primeiro converte o ácido aracdônico em PGG<sub>2</sub> que, por sua vez, é reduzido ao intermediário instável PGG<sub>2</sub> pelo sítio peroxidase, o qual não é inibido pelos AINEs. A partir daí, a PGH<sub>2</sub> é convertida pelas isomerases tissulares específicas em muitos prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos) (Fig. 1).

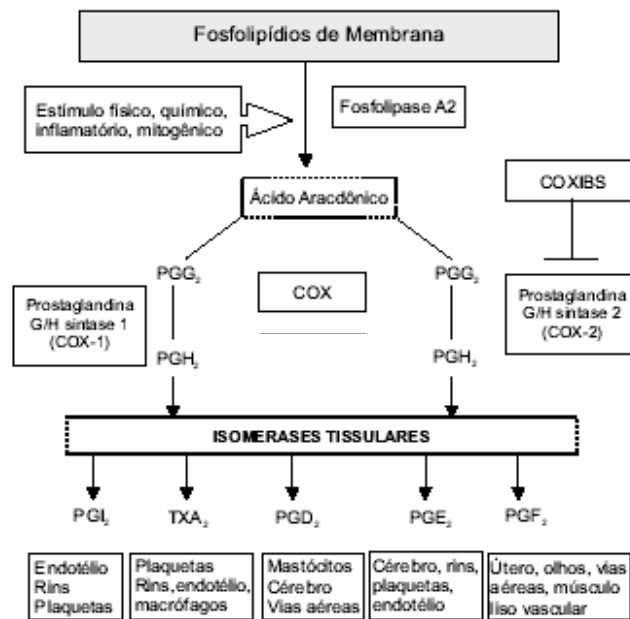


Figura 1 – Produção de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) a partir do metabolismo do ácido aracdônico. (KUMMER E COELHO, 2002).

A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tecidos, incluindo estômago, fígado e células epiteliais do trato gastrointestinal. A COX-2 é uma enzima induzível e responsável pelo aumento da formação de prostaglandinas em sítios de inflamação. A expressão da COX-2 também tem sido demonstrada em tecidos sinoviais de pacientes portadores de artrite reumatóide. A inibição da COX-1, a isoforma expressa no estômago pode ser responsável pelas injúrias gastrintestinais e úlceras pépticas em pacientes fazendo uso de AINEs. Contudo, a COX-1 e a COX-2 são duas proteínas estruturalmente distintas, apresentando uma homologia de 60% na sequência de aminoácidos do seu DNA complementar (CULLEN *et al*, 1998).

Embora aproximadamente 60% homólogas e com similares mecanismos de metabolização do ácido aracdônico, as isoformas COX-1 e 2 apresentam algumas diferenças como: sequência genética diferente para cada isoforma; sítio de ligação do agente inibidor na

isoforma COX-2 estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1. Sendo a COX-2 uma enzima presente na maioria dos tecidos e em quadros inflamatórios, a atividade dessa isoforma pode ser alterada cerca de 2 a 4 vezes, enquanto que a COX-1 encontra-se em determinados tecidos como cérebro, intestinos, rins, testículos, glândula tireóide, pâncreas e/ou diante de quadro inflamatório, onde sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes ou mais. Além do ácido aracdônico, a COX-2 também é capaz de agir no metabolismo de outras substâncias como o ácido linoleico (VANE *et al*, 1998). Durante a ação da COX-2, ou seja, na conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas vasoativas, há formação de radicais livres de oxigênio. A presença destes radicais no processo inflamatório pode fazer com que a lesão no tecido seja ainda maior. Há evidências de que substâncias endógenas antioxidantes estejam com seus níveis diminuídos em processos inflamatórios agudos e crônicos, resultando em balanço negativo entre a produção destas substâncias e a geração de radicais livres, o que leva ao dano oxidativo das células (REGAN *et al*, 2008).

Há alguns anos foi proposta a existência de uma terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e da COX-2, não produziria prostanoídes pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias. Tal evidência poderia explicar os períodos de remissão vistos em casos de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (KUMMER E COELHO; 2002).

Em geral, os AINES inibem, de forma variável, ambas as isoformas COX em suas dosagens terapêuticas. Desse modo, passaram a ser caracterizados de acordo com sua capacidade de inibição COX-1 e COX-2. Tal característica é expressa em termos de IC50 (concentração necessária para inibir 50% da atividade COX), usando sistemas de testes *in vitro*. Razões de IC50 para COX-1 e COX-2 são calculadas para avaliar a capacidade de inibição de cada isoforma; uma baixa relação COX-2/COX-1 implica ser o agente relativamente seletivo para COX-2. Tais relações podem ser usadas como guia para a possível seletividade *in vivo* de um determinado composto (SOUTER *et al*, 1994)

Modelos experimentais de inflamação aguda como induções do processo inflamatório pela carragenina têm sido usados para investigar o perfil de atividade dos AINEs. Esse modelo é uma reação COX-dependente e é usado para determinação da inibição desta enzima. Já os modelos de inflamação crônica, como a implantação de corpos estranhos, são usados para investigar os efeitos dos fármacos na fase crônica da inflamação (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

O uso de modelos experimentais com animais, para avaliações qualitativas e quantitativas de dor e inflamação, é considerado muito importante para este tipo de estudo (HEILBORN *et al*, 2007). Uma pesquisa utilizando modelos experimentais *in vivo*, realizada

por Gupta e colaboradores (1996), demonstrou uma maior atividade anti-inflamatória do gel contendo nimesulida, quando comparado a géis contendo diclofenaco e/ou piroxicam. Beck e colaboradores (2000) demonstraram que nanoesferas contendo dexametasona, administradas por via intraperitoneal, foram capazes de diminuir de forma significativa o edema de pata induzido pela carragenina.

Estudos *in vivo* realizados com sistema carreador contendo nanoesferas poliméricas de indometacina demonstraram uma efetiva ação anti-inflamatória da formulação, diminuindo o edema de pata em ratos induzido por carragenina quando administrado por via oral (POHLMANN *et al*, 2007).

Estudos recentes têm atribuído uma atividade reguladora à COX, principalmente à COX-2, em várias desordens neurológicas, incluindo *Mal de Alzheimer* e epilepsia. A função exata dessa enzima no sistema nervoso central de mamíferos ainda não foi bem explorada, particularmente nas situações neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Alguns estudos têm sugerido que há um aumento na expressão da COX-2 em cérebro de ratos, após estímulo elétrico (DHIR *et al*, 2007).

Dentre os agentes que mostram algum grau de inibição preferencial da COX-2 podem-se citar o meloxicam e a nimesulida. Para estes compostos, por exemplo, tem sido difícil atribuir relação de segurança gastrointestinal quando comparados com os demais AINES convencionais, já que apesar de preferencial inibição COX-2, as doses terapêuticas destes fármacos também resultam em redução na atividade COX-1 (KUMMER E COELHO, 2002).

Vane (1971) foi o primeiro a propor que os efeitos terapêuticos e colaterais dos anti-inflamatórios não esteroides resultavam da inibição da enzima ciclo-oxigenase por estes compostos. Assim, tais agentes reduzem a síntese de prostaglandinas, diminuindo a intensidade do processo inflamatório e consequentemente a nocicepção periférica. Também tem sido atribuído a tais agentes algum efeito antinociceptivo central (SOUTER *et al*, 1994), ou seja, quanto maior a lipossolubilidade do fármaco, maior será a passagem e o efeito dos AINEs no sistema nervoso central (SNC), isto é, esse efeito vai depender de sua entrada no SNC. Alguns efeitos adversos dos AINEs, como alterações de humor, percepção e cognição, são decorrentes dessa ação central (SAKATA E ISSY, 2008).

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Segundo Briganti e Picardo (2003) radical livre é definido como qualquer átomo, molécula, ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas

camadas de valência. São exemplos de radicais livres: o oxigênio molecular ( $O_2$ ), radical peróxil ( $ROO^\cdot$ ), radical alcoxil ( $RO^\cdot$ ), ácido nítrico ( $NO^\cdot$ ), ânion superóxido ( $O_2^\cdot$ ) e radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ). Destes, o  $OH^\cdot$  e o  $O_2^\cdot$  são os de maior importância biológica, pois são formados durante o processo normal ou exacerbado de redução do  $O_2$  no interior das mitocôndrias, ou devido à redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pelo ânion  $O_2^\cdot$  catalisada por redutores como  $Fe^{+2}$  ou  $Cu^+$ .

Os radicais livres são formados na mitocôndria, que pode ser considerada “a usina energética” das células. Nas mitocôndrias, a célula produz energia a partir da glicólise e do  $O_2$ . Nesse processo, os radicais livres são formados e imediatamente neutralizados pelas enzimas antioxidantes existentes dentro da mitocôndria. Essas enzimas apresentam vários minerais na sua composição, como: ferro, manganês, zinco e selênio. No caso de deficiência na síntese dessas enzimas seja por falta dos minerais necessários, seja pelo excesso de  $O_2$  a ser metabolizado, haverá um aumento dos radicais livres que podem sair da mitocôndria, lesando a célula. Além do dano interno na célula, esses radicais podem ir para a corrente circulatória, sendo, nesse caso, neutralizados pelas substâncias antioxidantes não enzimáticas (vitamina C, E, A, b caroteno, riboflavina, etc.). Os radicais livres os quais não forem neutralizados serão os geradores do dano oxidativo (LIMA E ABDALLA, 2001). A figura 2 demonstra a atividade dos radicais livres sobre a membrana celular.

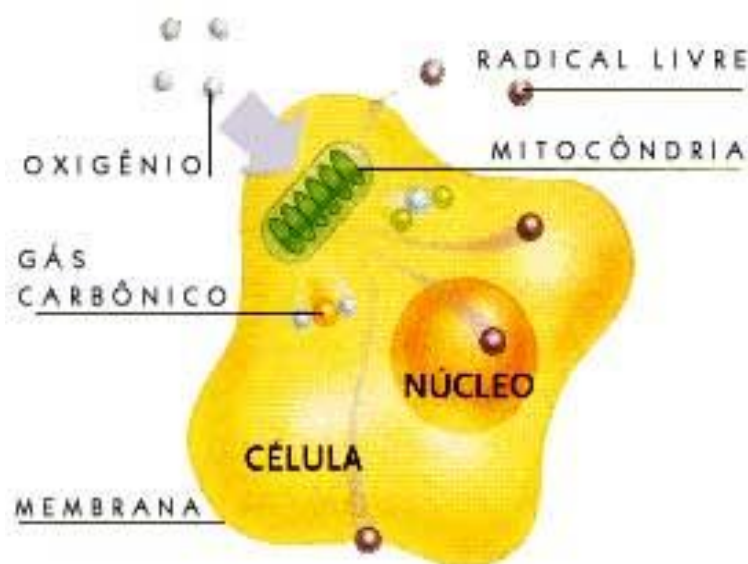


Figura 2 – Produção de radicais livres (adaptado de NUNES, 2006).

Os radicais livres possuem um tempo de vida extremamente curto. Isso se deve à instabilidade eletrônica que apresentam, resultando na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo a formação de outros radicais livres, como os radicais peroxil e alcóxil, formados durante a lipoperoxidação das membranas celulares. Esses radicais livres e demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas nos sistemas biológicos são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BRIGANTI E PICARDO, 2003).

A resposta inflamatória, um componente vital da defesa, pode ser extremamente danosa e potencialmente fatal se não for seguramente regulada. Assim, muitas células adquirem sistemas endógenos de defesa antioxidante, considerados pré-requisitos para a manutenção da forma estável do organismo sob tais condições danosas (KHANDUJA *et al*, 2006).

Sendo assim, o organismo dispõe de mecanismos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico, glutatona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente. No segundo caso, quando há uma exposição às EROs, o organismo sintetiza proteínas (enzimas) antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPX) para decomponem, respectivamente, o ânion  $O_2^-$ , o  $H_2O_2$  e os lipoperóxidos. Quando essa proteção é insuficiente, ocorre o estresse oxidativo (LIMA E ABDALLA, 2001). O balanço entre os EROs e os agentes antioxidantes é o melhor mecanismo na prevenção do estresse oxidativo (WU *et al*, 2007).

Além de fatores externos, como a radiação ultravioleta, fatores endógenos também podem ser geradores de estresse oxidativo. Algumas dessas situações são: a ativação de fagócitos por micro-organismos e os processos inflamatórios. As células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológica, para eliminar micro-organismos patogênicos; nas doenças inflamatórias, esta produção torna-se excessiva, provocando lesões nos tecidos. Na “cascata” inflamatória, há uma excessiva produção de radicais livres. O ácido aracdônico, metabolizado via ciclo-oxigenase e lipooxigenase, gera mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos. A partir da síntese desses agentes, é desencadeada uma produção exacerbada de radicais livres. O óxido nítrico, em especial pelo seu efeito tóxico como radical livre, contribui de forma importante para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios, principalmente crônicos (BRIGANTI E PICARDO, 2003)

Regan e colaboradores (2008) demonstraram que a enzima superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), um componente fundamental do mecanismo endógeno de defesa antioxidante, está extremamente diminuída em articulações humanas com osteoartrite. Através de artrocentese em pacientes com osteoartrite e em pacientes com a cartilagem da articulação em condições fisiológicas normais, os autores detectaram um nível de 5,6 pg/μg proteína e 11,3 pg/μg proteína de EC-SOD, respectivamente. Esse dado corrobora com o fato de que, durante o processo inflamatório, pode ser desencadeado um dano oxidativo, seja por aumento da produção de radicais livres, seja pela diminuição dos componentes do sistema de defesa endógeno.

O dano oxidativo mediado por EROs envolve alterações em um amplo número de moléculas biológicas, como modificações no DNA, peroxidação lipídica e secreção de citocinas inflamatórias. Num processo inflamatório, esses danos podem ser ainda mais severos em virtude de uma maior produção dessas citocinas. Os radicais livres estão relacionados com uma variedade de doenças incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Na maior parte dos casos, esta relação se dá pela propriedade que os radicais livres têm de reagir com os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), servindo como iniciadores no processo de peroxidação lipídica, também chamada lipoperoxidação (LPO) (PATTANAYAK E SUNITA, 2008).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, à falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. As alterações nas membranas levam a transtornos de permeabilidade alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas na célula, além de oxidação da LDL (*Low-density lipoprotein*) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina). A lipoperoxidação pode ocorrer por duas vias: uma via enzimática, envolvendo a ciclo-oxigenase e lipooxigenase, na oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados; e outra pela peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROs, metais de transição e outros radicais livres (LIMA E ABDALLA, 2001).

A nimesulida, além de sua ação anti-inflamatória, apresenta ainda atividade antioxidante. Para os AINEs, essa ação é considerada de grande interesse, pois a produção de radicais livres, além de contribuir na inflamação e na dor causa danos aos tecidos (VANE et al, 1998). A base racional para o *design* da nimesulida foi, justamente, baseada na premissa de



que os radicais livres eram fatores críticos na doença inflamatória crônica e a remoção destes radicais poderia desencadear novas atividades anti-inflamatórias no controle das condições inflamatórias crônicas. A estrutura química da nimesulida lhe confere um mecanismo de atividade antioxidante, através do qual o fármaco é capaz de neutralizar a formação de radicais livres de oxigênio produzidos durante a cascata do ácido aracdônico e liberados em grande quantidade nos processos inflamatórios por diversos tipos de célula (granulócitos, neutrófilos, macrófagos), sem influenciar a quimiotaxia e a fagocitose (KONTOGIORGIS *et al*; 2002).

Certos AINEs, como a nimesulida, podem desencadear suas ações por inibição direta da COX, ou por mecanismos independentes desta, como supressão da inflamação do tecido através da diminuição da interação dos leucócitos com células endoteliais; aumento da expressão de moléculas anti-inflamatórias; redução da produção de citocinas pirogênicas (tromboxanos) e inibição da formação de radicais livres de oxigênio (KHANDUJA *et al*, 2006).

Com o objetivo de investigar os efeitos da nimesulida sobre a produção de agentes oxidantes, Khanduja e colaboradores (2006) realizaram experimentos com a nimesulida, *in vitro* e *in vivo*, através do modelo de indução de inflamação pulmonar por lipopolissacarídeo (LPS), um agente flogístico comumente usado em modelos animais para induzir resposta inflamatória. Nos estudos *in vivo*, os animais foram divididos em grupos, dos quais um deles recebeu um pré-tratamento com nimesulida (2,88 mg/Kg) via oral durante uma semana, antes da administração intratraquel de LPS; o segundo grupo não recebeu o pré-tratamento com o fármaco, e o terceiro grupo foi o controle. Após 18 horas os animais foram sacrificados. Através de aspiração foi retirada uma amostra de fluido broncoalveolar, e os níveis de óxido nítrico foram determinados. Para o grupo que recebeu o pré-tratamento, observou-se que a nimesulida reduziu, efetivamente, para níveis basais, a produção de óxido nítrico em relação aos demais grupos. Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da nimesulida, foi usado para análise fluido de lavagem broncoalveolar de animais não tratados, de onde foram isolados macrófagos alveolares, cultivados por 20 horas, estimulados com LPS e após tratados com nimesulida em vários intervalos de tempo. Ao término do experimento foi feita dosagem de malondialdeído (MDA) – um dos produtos gerados durante a peroxidação lipídica - quando a nimesulida demonstrou uma atenuação significativa na produção de MDA em relação aos grupos não tratados com nimesulida. Esses resultados sugerem que a nimesulida é capaz de captar radicais livres de modo direto, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inibindo ou reduzindo a peroxidação lipídica.

Schaffazick e colaboradores (2008) realizaram um estudo em que foi desenvolvida uma formulação com nanocápsulas poliméricas contendo melatonina, um neuro-hormônio derivado da serotonina, sintetizado principalmente pela glândula pineal. A melatonina possui funções como controle do ciclo de sono/vigília, imunoestimulação, citoproteção e atividade antioxidante. O objetivo do estudo foi comparar o efeito antioxidante agudo, através de injeção intraperitoneal, da formulação contendo melatonina nanoestruturada em comparação com a melatonina em solução aquosa. Através do método de *TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)* no qual são quantificados os níveis de malondialdeído (MDA), os autores observaram que a solução aquosa de melatonina não exerceu atividade antioxidante, enquanto a administração de melatonina em nanocápsulas causou uma redução da peroxidação lipídica nos tecidos cerebrais estudados (córtex frontal e hipocampo).

A quercetina - um flavonóide encontrado em frutas - vegetais e ervas, tem sido extensivamente investigada devido às suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Wu e colaboradores (2008) desenvolveram e caracterizaram uma formulação com nanopartículas de quercetina com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante do flavonóide quando nanoestruturado. Através de estudos de liberação, os autores observaram uma liberação 74 vezes maior da quercetina em nanopartículas se comparada com a substância pura. Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados vários testes, dentre eles, o método de captação do radical DPPH, técnica *in vitro* usada para determinação da atividade antioxidante, no qual foi possível observar maior atividade antioxidante da quercetina nanoparticulada em comparação com a substância pura.

### 2.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES (AINEs)

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) possuem atividade anti-inflamatória, anti-alérgica, analgésica e antipirética, sendo frequentemente indicados para o tratamento de estados inflamatórios agudos ou crônicos, como: luxação, tendinite, processos inflamatórios dentários, artrite, psoríase e asma (STEENBERGER *et al*, 1998).

Os AINEs fazem parte de uma das classes de medicamentos mais prescritos em todo o mundo para o tratamento de dor e das inflamações associadas a diversas síndromes dolorosas, além de estarem entre os mais utilizados nas práticas de automedicação. Esses fármacos apresentam um “teto” para o efeito terapêutico, ou seja, a sua administração em doses superiores às recomendadas não proporciona analgesia suplementar, aumentando a incidência dos efeitos colaterais (SAKATA E ISSY *et al*, 2008).

Todos os AINEs podem causar vários efeitos colaterais em grande parte dos pacientes tratados com administração oral, incluindo irritação da mucosa gástrica e toxicidade hepática e renal (KONTOGIORGIS *et al*, 2002).

A absorção dos diversos tipos de AINEs é semelhante quando administrados através das vias oral, muscular ou retal. Para a maioria dos AINEs a ligação à proteínas plasmáticas é maior que 90%, e, se a concentração plasmática for maior que a capacidade de fixação, haverá aumento desproporcional de fármaco livre e conseqüentemente um aumento dos efeitos colaterais (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

A maioria dos AINEs apresenta metabolismo hepático, e sua duração de ação varia bastante, cerca de 4 a 24 horas. Normalmente o intervalo para o uso de AINEs de meia-vida curta é de 6 a 8 horas; para os de meia-vida média é de 12 horas, e para os de meia-vida longa, de 24 horas (SAKATA E ISSY *et al*, 2008).

Como os AINEs são metabolizados rapidamente pelo fígado, sua administração parenteral diminui o efeito de primeira passagem e aumenta significativamente a biodisponibilidade. A metabolização hepática ocorre por reações de conjugação, oxidação, glucoronidação e acetilação, sendo pequena parte do fármaco excretada de forma inalterada na urina (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

As propriedades físico-químicas determinam a distribuição dos AINEs nos tecidos e são responsáveis pelas diferenças nas características que podem influenciar na eficácia terapêutica. Os fatores mais importantes são a lipossolubilidade e a constante de ionização (pKa). Muitos dos AINEs são ácidos fracos, com pKa em torno de 2 a 5. A proporção de fármaco não ionizado (em estado lipossolúvel) que existe em pH fisiológico pode influenciar na distribuição do fármaco nos tecidos (SÜLEYMAN *et al*, 2004).

Os AINEs são captados preferencialmente pelos tecidos inflamados, porém, podem, ainda, se concentrar na mucosa gástrica e nos rins, os quais constituem os principais locais de efeitos adversos (RAINSFORD; 1999).

Em geral, os AINEs são absorvidos de forma rápida e extensiva quando administrados por via oral e o volume de distribuição é pequeno. Difundem-se lentamente no fluido sinovial e permanecem em concentrações relativamente estáveis, aproximadamente 60% da média da concentração plasmática. Após administração oral, são encontradas grandes concentrações de AINEs em tecidos inflamados, parede gástrica, rins, fígado, medula óssea e sangue (SAKATA E ISSY, 2008).

O efeito dos AINEs na produção de prostaglandinas é a principal causa de toxicidade, refletindo em disfunções plaquetárias, broncoespasmo, alteração da função renal, hipertensão

arterial e úlcera péptica comumente associados ao seu uso. Além da inibição da biossíntese de prostaglandinas, os AINEs também são responsáveis por múltiplos efeitos no processo inflamatório, como: redução dos ácidos graxos livres dos leucócitos; inibição da formação de lipídios de membrana; inibição da migração de leucócitos; desacoplamento da fosforilação oxidativa; inibição da síntese de mucopolissacarídeos; ação antioxidante; estabilização das membranas lipossômicas; inibição da agregação de neutrófilos, entre outros (SAKATA E ISSY, 2008).

Gastropatias e toxicidade renal são os efeitos colaterais mais relatados dos AINEs e constituem-se, conseqüentemente, no maior interesse para o desenvolvimento de alternativas para administração desses fármacos. Em Israel e no Uruguai foram relatados, também, casos de hepatite e falência fulminante do fígado devido a reações da nimesulida (RAINSFORD, 1999). Entre abril de 1996 e janeiro de 1997, no Hospital Universitário Gasthuisberg, em Leuven, na Bélgica foram observados seis casos de hepatite aguda após tratamento com nimesulida (STEENBERGER *et al*, 1998). O risco de perfuração e ulceração gástrica apresenta incidência 3 a 4 vezes maior em usuários de AINEs (RAINSFORD; 1999).

Os danos hepáticos desenvolvidos após um período aproximado de 1 a 5 semanas, através da administração oral de AINES, tendem a vir acompanhados de febre, “rash”, eosinofilia, bem como infiltração granulomatosa no fígado (STEENBERGER *et al*, 1998). Alguns estudos mostram, ainda, que os AINEs estão associados com uma gama de lesões renais tubulares, intersticiais, glomerulares e vasculares (WEDER *et al*, 2006).

A síntese de prostaglandinas nos túbulos renais interfere no metabolismo de sódio e água corporais, sendo produzidas principalmente por intermédio da COX-1. Os AINEs, conseqüentemente, podem ocasionar edema e retenção de sal, estes estão entre os mais comuns efeitos adversos AINEs-associados envolvendo o rim (KUMMER E COELHO; 2002). Apesar do risco de toxicidade renal associada com o uso de AINES convencionais ser relativamente baixo, cerca de 5% dos indivíduos em uso de tais agentes podem desenvolver uma ou mais complicações renais. Tal estimativa pode aumentar principalmente, diante de fatores de risco, como idade avançada, insuficiência cardíaca, cirrose hepática, doença renal prévia, uso concomitante de outros medicamentos, hipovolemia, dentre outros (KUMMER E COELHO; 2002).

O fato do avançar da idade ser associado a um declínio progressivo da função renal gera sérias implicações para a segurança do uso de anti-inflamatórios em pacientes idosos (TRAVERSA *et al*, 2007).

Quase todas as classes de agentes anti-hipertensivos, com exceção dos bloqueadores de canais de cálcio e antagonistas da angiotensina II, necessitam de síntese normal de prostaglandinas vasodilatadoras para completa atividade anti-hipertensiva. Assim, AINEs, quando absorvidos sistemicamente, impedem a completa efetividade terapêutica de muitos compostos anti-hipertensivos e, inclusive, de fármacos diuréticos (SAKATA E ISSY, 2008).

Os danos na mucosa gástrica podem ocorrer via inúmeros mecanismos, tais como: irritação tóxica direta do epitélio gastrintestinal, enfraquecimento das propriedades de barreira da mucosa, redução do fluxo sanguíneo na parede gástrica, interferência no reparo de danos superficiais e supressão da síntese gástrica de prostaglandinas, através da inibição não seletiva da COX-1 (WHITTLE.; 2002).

A COX-1 parece ter fundamental papel em manter a arquitetura glandular do estômago. Constitui-se na única isoforma identificada na mucosa gástrica de animais normais, incluindo humanos, estando intimamente envolvida na prevenção de erosões e ulcerações (FAMAHEY, 1997). Entretanto, diante de infecções ou úlceras gástricas já formadas, observa-se maior expressão de COX-2 nas células epiteliais do estômago, induzindo a formação de prostaglandinas que contribuem para a cicatrização destas lesões. Essas prostaglandinas agem estimulando a secreção de fluidos e cloretos pela mucosa, o que impede a invasão de bactérias na circulação sistêmica. (KUMMER e COELHO; 2002).

O provável mecanismo para a toxicidade gástrica dos AINEs é a inibição da atividade da isoforma COX-1, que produz as prostaglandinas citoprotetoras. Estas são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica, reduzem a secreção de ácido, aumentam a secreção de bicarbonato e melhoram o fluxo sanguíneo na microcirculação da mucosa (FAMAHEY; 1997).

Os AINEs têm sido usados, por mais de 100 anos, no tratamento de várias moléstias, embora exista um limite de frequência na terapia com estes fármacos, devido aos efeitos colaterais que desencadeiam (KONTOGIORGIS *et al*, 2002). Em virtude disso, o uso da via tóxica tem sido uma alternativa para aqueles pacientes que necessitam de tratamento por prolongado período de tempo (SHAHIWALA *et al*, 2002), como a terapia de doenças crônicas, a qual requer repetidas administrações do fármaco, principalmente no caso de um agente de meia-vida curta, onde a administração deve ser feita em pequenos intervalos de tempo, várias vezes ao dia (MÜLLER-GOYMANN; 2004).

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se obter um controle na liberação de AINEs. Intensificação da penetração na pele por sono ou iontoforese tem sido insuficiente para esse propósito. Organelas fosfolipídicas, lipossomas convencionais,

vesículas ultradeformáveis ou nanopartículas têm sido testadas para esse fim. Pesquisas com esse tipo de carreadores têm obtido um efeito benéfico na liberação de AINEs nos tecidos subcutâneos (CEVC E BLUME, 2008).

Existe hoje uma diversidade de aplicações para sistemas carreadores de anti-inflamatórios, como tratamento de doenças músculoesqueléticas, inflamações cutâneas, uso de anti-inflamatórios como adjuvantes na quimioterapia a ainda no tratamento de processos inflamatórios de córnea. Nessa última situação, a eficácia do fármaco é fortemente influenciada pelo de contato com a córnea, e o método mais eficaz para promover um maior tempo de residência pré-corneal é o uso de sistemas de liberação controlada de fármacos. Isso foi demonstrado em um estudo com coelhos onde foram testadas formulações contendo indometacina e nimesulida em sistemas nanoestruturados. Como resultado obteve-se maior biodisponibilidade e tempo de permanência pré-corneal do fármaco nanoestruturado significativamente maior do que o fármaco livre em suspensão aquosa (GUPTA *et al*, 2003).

Dentre os inúmeros estudos atuais realizados objetivando a via tópica para administração de AINEs, destaca-se uma pesquisa desenvolvida por Cornélio e Maiorga (2007) quando foi avaliada a penetração cutânea do flurbiprofeno comparado com o fármaco adicionado a diferentes promotores de absorção tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, como miristato de isopropila, Miglyol 840<sup>®</sup>, Cetiol V<sup>®</sup>, polietilenoglicol 400, propilenoglicol, entre outros. Através de experimentos de difusão em célula de Franz, utilizando como membrana a pele de orelha de porco, os autores observaram um excelente fluxo de permeação do flurbiprofeno sem adição de promotores de absorção, em torno de 208  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , o qual foi otimizado pela adição de alguns dos veículos testados como o Cetiol V<sup>®</sup> (397  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e do miristato de isopropila (399  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), os quais praticamente dobraram o valor do fluxo. Os autores concluem, a partir desses dados, que o flurbiprofeno pode ser identificado como um excelente candidato para administração tópica.

A liberação local exige maior farmacocinética dos AINEs por duas razões: primeiramente, pela dificuldade de superar a barreira da pele e, subsequentemente, pela necessidade de liberação cutânea. Um dos grandes problemas com essa liberação local são as moléculas com alto coeficiente de permeabilidade na pele, como os AINEs, que são moléculas que podem facilmente passar para a corrente sanguínea. (PUGLIA *et al*, 2008). O ideal é que deva haver o mínimo de propensão do anti-inflamatório a atingir as camadas mais profundas da pele, evitando, assim, a difusão para a corrente circulatória (CEVC E BLUME, 2008).

O tratamento de doenças de pele, bem como as de distúrbios musculoesqueléticos, podem ser extremamente beneficiadas com uma terapia de administração tópica, obtendo-se uma redução substancial dos efeitos colaterais sistêmicos e contribuindo para a adesão do paciente ao tratamento. A aplicação tópica de fármacos é ainda um desafio para indústria farmacêutica devido a algumas dificuldades que ainda existem, como o controle exato da liberação do fármaco e a determinação do total exato deste que irá alcançar as diferentes camadas da pele. O ingrediente farmacêutico ativo bem como as características físico-químicas podem ser as principais características responsáveis pela distribuição diferenciada do fármaco na pele (PUGLIA *et al*, 2008).

Os AINEs podem ser considerados, hoje, como uma das classes de fármacos mais promissoras para o uso tópico. Muitos fatores fazem com que esses fármacos sejam um dos alvos das pesquisas sobre a utilização da via tópica para administração de ativos, como: o grande número de prescrições médicas, o amplo espectro de ação, a necessidade de ação local sustentada e os inúmeros efeitos colaterais causados pela administração de AINEs (PARDEIKE *et al*, 2008).

## 2.4 NIMESULIDA

A nimesulida é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) que possui ótimo perfil de atividade, alto índice terapêutico e uma segurança relativa (STEENBERGER *et al*, 1998). A nimesulida é um AINE da classe das sulfonamidas, pois possui um radical sulfonamida no lugar do radical carboxila, o qual apresenta potentes características anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (Fig. 3). O nome químico da nimesulida é 4-nitro-2-fenoxi-trifluorometano-sulfonamida. É considerada um fármaco inibidor mais seletivo para ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) do que para a ciclo-oxigenase tipo I (COX-1). Do ponto de vista químico, a presença de um grupamento sulfonamida nos inibidores da COX-2 parece importante para a seletividade do fármaco (FAMAHEY *et al*, 1996).

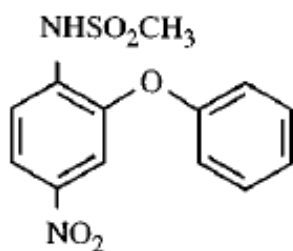


Figura 3 - Estrutura química da nimesulida (4-nitro-2-fenoxi-trifluorometano-sulfonamida) (VANE *et al*, 1998).

A nimesulida foi desenvolvida por George Moore e colaboradores nos laboratórios da indústria farmacêutica Riker, em meados de 1975, e seu desenvolvimento precedeu a descoberta da enzima ciclo-oxigenase e, com ela, a importância das prostaglandinas na inflamação e na dor.

Em 1980, foi licenciada pela companhia de saúde suíça Helsinn Healthcare SA, que continuou a investir em pesquisas intensivas no fármaco. Isto serviu de base para investigações polivalentes que permitiram o registro e a comercialização mundial do fármaco (KONTOGIORGIS *et al*, 2002).

Embora apresente efeitos colaterais, a nimesulida tem sido bem tolerada tanto por adultos e idosos quanto por pacientes pediátricos (STEENBERGER *et al*, 1998).

A nimesulida exerce sua atividade através de inúmeros mecanismos, como:

- Inibição da produção de radicais livres de oxigênio, que contribuem para a inflamação e dor;
- Diminuição substancial da atividade da via mieloperoxidase, que forma ácido hipocloroso, nos neutrófilos ativados;
- Proteção da  $\alpha_1$ -anti-tripsina resultante da oxidação mediada pelos neutrófilos, possivelmente atenuando a atividade elastolítica dos neutrófilos;
- Diminuição da ação das citocinas;
- Inibição da liberação de histamina dos mastócitos e dos basófilos;
- Diminuição da síntese de IL-6 e urocinase, enquanto aumenta a produção de inibidor da ativação do plasminogênio 1. Estes efeitos podem ajudar a reduzir a degradação de cartilagem (SAKATA E ISSY, 2008).

Assim como os demais AINEs, o uso oral da nimesulida acarreta efeitos colaterais como toxicidade hepática, renal e gastrointestinal. A severidade da hepatotoxicidade associada à nimesulida é variável. Os eventos hepáticos descritos durante o tratamento incluem elevação reversível e assintomática das transaminases, hepatite aguda autolimitada, colestase, hepatite colestática, granulomas hepáticos até hepatite crônica, colestase crônica com ductopenia e falha hepática fulminante aguda (RAINSFORD;1999).

Alguns dados experimentais suportam o postulado que a inibição da COX pelos AINEs além de causar uma redução na síntese de PGs vasodilatadoras, desvia o ácido araquidônico para a via da lipoxigenase (LOX), aumentando, assim, a formação de leucotrienos. Isto causa uma vasoconstrição na mucosa gástrica e aumenta a formação de radicais livres resultantes da peroxidação lipídica, resultando em lesão na mucosa (BJARNASON *et al*, 1999).



A nimesulida é comercializada em mais de 50 países. Em março de 2002, a Finlândia suspendeu seu uso devido a uma alta incidência de hepatotoxicidade e, em maio de 2002, foi a vez da Espanha. Na Itália e em Portugal, a nimesulida é o AINE mais prescrito. Apesar da retirada da nimesulida na Finlândia e na Espanha, o risco de hepatotoxicidade desse fármaco é pequeno, e acredita-se que está diretamente ligado à idade (TRAVERSA *et al*, 2003). A maior característica dos danos induzidos pela nimesulida parece ser uma severa necrose hepatocelular (STEENBERGER *et al*, 1998).

Estudos utilizando modelos experimentais têm demonstrado maior atividade antipirética da nimesulida em relação ao paracetamol. Considera-se ainda que a ação anti-inflamatória não se deve à inibição da COX-1 presente no estômago e no fígado, mas sim devido à inibição seletiva da atividade da COX-2 induzida em sítios inflamatórios (TANIGUCHI *et al*, 1997).

Segundo Strauss (2008), a nimesulida apresenta, além da atividade anti-inflamatória, também atividade antioxidante, e, devido a isso, é capaz de promover uma ação neuroprotetora em lesões cerebrais. Normalmente, a COX-2 é rara ou ausente em muitos órgãos do corpo, entretanto níveis significantes dessa enzima são detectados em cérebros de mamíferos. No cérebro normal a COX-2 é encontrada, basicamente, no corpo celular e nos dendritos de neurônios; porém, em lesões cerebrais, como no caso de uma isquemia, há uma super expressão dessa enzima.

Existem relatos de que a severidade do dano cerebral em doenças isquêmicas esteja diretamente relacionada com os níveis da COX-2. A partir de um dano neuronal, o ácido aracdônico é convertido em prostaglandinas, o que gera a produção de EROs, podendo resultar em peroxidação lipídica devido à alta geração de radicais livres. Estes causam danos nas membranas neuronais, o que faz gerar um “ciclo vicioso” de dano cerebral / geração de radicais livres.

Nesse sentido, o uso de AINEs como a nimesulida tem sido uma alternativa para o tratamento de lesões cerebrais devido, principalmente, a duas ações: inibição direta da COX-2 e supressão da formação de radicais livres (DHIR *et al*, 2007; CANDELARIO-JALIL; 2008).

Estudos recentes têm investigado, ainda, uma ação antiepilética da nimesulida, em virtude da inibição seletiva da COX-2, a qual está relacionada com várias desordens neurológicas. Dhir e colaboradores (2007) avaliaram a atividade desse fármaco em ratos estimulados por pentilenetetrazol (PTZ), um estimulante do sistema nervoso central usado em desordens mentais. Os autores observaram que o pré-tratamento com nimesulida atenuou de

forma significativa as alterações bioquímicas e comportamentais induzidas pelo PTZ, o que demonstra um efeito benéfico da nimesulida como agente neuroprotetor na epilepsia.

*In vitro*, a nimesulida reduz a formação de prostaglandinas em incubações com leucócitos estimulados mais potentemente do que na mucosa gástrica, sugerindo uma inibição mais seletiva para a COX-2 (GUPTA *et al*, 1996). A COX-2 é praticamente não detectável na maioria dos tecidos sob condições fisiológicas, mas sua expressão pode ser consideravelmente aumentada durante um processo inflamatório. Estudos prévios sugerem um efeito inibidor mais potente da biossíntese de prostaglandinas em áreas inflamadas do que em outros tecidos (FAMAHEY *et al*, 1997).

A nimesulida apresenta uma meia-vida de eliminação do plasma em torno de 2 a 5 horas, com alguma variação, dependendo do tipo de formulação oral. Seu principal metabólito é o 4-hidroxi. O tempo que decorre até ao aparecimento deste metabólito na circulação é reduzido, cerca de 45 a 50 minutos. A sua constante de formação não é elevada, sendo consideravelmente inferior à sua constante de absorção (SAKATA E ISSY, 2008). A nimesulida atravessa de forma extremamente rápida a barreira hemato-encefálica (CANDELARIO-JALIL; 2008).

A percentagem reduzida de fármaco eliminado na forma inalterada indica que a nimesulida é eliminada majoritariamente após a transformação metabólica. É excretada na urina (50,5 - 62,5%), sendo 1 a 3% sob a forma de composto não modificado. Pode ocorrer também excreção fecal numa percentagem de 17,9 a 36,2%, havendo 6,3-8,7% de fármaco intacto nas fezes (RAINSFORD; 1999).

Um estudo com ratos realizado por Tofanetti e colaboradores (1999) demonstrou que uma única administração oral de nimesulida, quando comparada com uma única administração oral de indometacina, diminuiu a síntese de prostaglandinas em exudatos inflamados em modelos *in vivo* como indução de edema de pata de rato pela carragenina e indução de granuloma por implantes de algodão.

Uma pesquisa *in vivo* realizada através de tratamento agudo e subagudo com AINEs utilizando edema de pata induzido por carragenina, demonstrou um menor perfil ulcerogênico da nimesulida em relação à indometacina e ao diclofenaco após administração oral (GODESSART *et al*, 1996).

Estudos *in vitro* também têm sido realizados com a nimesulida na forma nanoestruturada, demonstrando que esses sistemas nanocarreadores são capazes de promover maior penetração do fármaco no estrato córneo da pele em comparação ao fármaco livre (ALVES *et al*, 2007).

## 2.5 SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SURI *et al*, 2007). A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi recentemente denominada "Nanomedicina" pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos (MOGHIMI *et al*, 2005).

Essa tecnologia surgiu na década 60 com o desenvolvimento da microencapsulação, técnica na qual polímeros e outras substâncias são transformados em partículas de tamanho micrométrico e após são encapsulados. A microencapsulação é bastante utilizada na indústria farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis e o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhora da biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas. Logo em seguida, a descoberta dos lipossomas veio aumentar a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica (LASIC; 1998).

Os sistemas coloidais de natureza lipossomal têm sido ativamente estudados até agora. Desde 1968, várias pesquisas têm sido dedicadas ao uso potencial desses sistemas como sistema de vetorização biocompatível, assim como na elucidação e solução de seus problemas fundamentais como a sensibilidade das membranas fosfolipídicas à degradação biológica. Nos anos 90, surgiram nanossistemas mais sofisticados revestidos por polímeros hidrofílicos, denominados sistemas furtivos, que permitem um tempo de circulação maior no organismo (BARRAT *et al*, 2000).

Entre os diferentes carreadores, os lipossomas e os niossomas são bem documentados para a liberação transdérmica de fármacos. Estudos demonstraram que a aplicação intradérmica de AINEs lipossomados em articulações inflamadas resultou na concentração do fármaco no fluido sinovial, não excedendo para o plasma, sugerindo, assim, uma vetorização do ativo diretamente na articulação (SHAHIWALA *et al*, 2002).

Um estudo realizado por Shahiwala e colaboradores (2002) testou a aplicação tópica de um gel contendo niossomas de nimesulida em comparação com um gel contendo o fármaco na forma livre e com a formulação comercial (Nimulid<sup>®</sup> Transgel), utilizando como membrana a pele humana de cadáver. A formulação contendo niossomas de nimesulida

apresentou alta retenção do fármaco na pele (58.56%), enquanto que, para o produto comercial, a retenção foi de 11.18% e para o gel contendo o fármaco na forma livre, foi de 8.18%. Os autores sugerem um efeito reservatório das nanopartículas, através da deposição dos niossomas contendo o ativo, aumentando, assim, a capacidade de retenção do fármaco no local aplicado.

Há cerca de vinte anos, formulações com nanopartículas poliméricas têm sido desenvolvidas como alternativa ao uso de formulações com o fármaco livre. Os principais objetivos para o desenvolvimento de nanocarreadores são promover a vetorização de fármacos como antibióticos ou antitumorais, diminuir a toxicidade de fármacos anti-inflamatórios, aumentar a biodisponibilidade ocular do fármaco, bem como aumentar a estabilidade de hormônios, proteínas e peptídeos no trato gastrointestinal (POHLMANN *et al*, 2007). A vetorização de fármacos é utilizada principalmente para solucionar os problemas ou limites que alguns fármacos possam apresentar nas formulações convencionais, como instabilidade química, física ou biológica, baixa solubilidade e/ou absorção, grande volume de distribuição ou baixa especificidade (GODIN *et al*, 2007).

Dependentemente da composição, estrutura e método de desenvolvimento, algumas das principais vantagens e/ou funções dos nanocarreadores são: prolongamento do tempo de circulação no sangue e habilidade de acumular-se em sítios específicos; habilidade de reconhecer, especificamente, o sítio de ligação do tecido ou célula via receptor de superfície; habilidade de responder às características do estímulo local da patologia e habilidade de penetrar na célula por degradação do polímero quando o alvo for intracelular (TORCHILIN; 2007).

Uma forma efetiva para alcançar a eficiência nessa liberação do fármaco tem sido baseada no entendimento de suas interações com: o ambiente biológico, a população de células-alvo, os receptores de superfície dessas células, as alterações que podem aparecer com a progressão da doença nesses receptores, o mecanismo e o sítio de ação, a retenção do ativo, a administração de múltiplas substâncias, os mecanismos moleculares e a fisiopatologia da doença (SURI *et al*, 2007).

Sistemas coloidais para entrega de fármacos como lipossomas, micelas ou nanopartículas, têm sido extensivamente investigados para o uso na terapia contra o câncer. Pesquisas recentes *in vivo* demonstraram a eficácia do paclitaxel em nanopartículas como agente anticancerígeno em tumor colorretal humano (SURI *et al*, 2007). Entre os diferentes tipos de nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas parecem oferecer uma alternativa interessante, possuindo uma alta estabilidade tanto em fluidos biológicos quanto durante o

armazenamento. Há alguns anos, um grande interesse tem sido focado nas nanopartículas como um promissor sistema de liberação de fármacos, devido às suas possibilidades de aumento da eficácia do ativo, redução da toxicidade e liberação controlada (GODIN *et al*, 2007).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1µm. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si, segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas que não apresentam óleo em sua composição são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

Os polímeros biodegradáveis estão entre os materiais que têm sido extensivamente utilizados, principalmente, por não apresentarem toxicidade ao corpo humano, pois são substâncias facilmente metabolizadas (HASIRCI *et al*, 2000). Esses polímeros propiciam uma melhor retenção do fármaco dentro da rede, permitindo uma degradação mais lenta e, conseqüentemente, uma liberação prolongada do ativo (MÜLLER *et al*, 2000). O perfil de liberação das nanopartículas poliméricas está diretamente ligado ao tipo de polímero empregado (POHLMANN *et al*, 2007).

Segundo Cevc e Blume (2008), nanopartículas coloidais não deformáveis, dependentemente do tamanho, muitas vezes não são capazes de atravessar a barreira intacta da pele, sendo usadas, principalmente, em situações que requeiram um perfil oclusivo ou semioclusivo do fármaco. Por outro lado, partículas ou vesículas ultradeformáveis têm capacidade de atravessar a barreira do estrato córneo e chegar a camadas mais profundas da pele, promovendo maior distribuição do ativo nos tecidos periféricos.

Dentre os tipos de nanossistemas, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) diferem das nanopartículas poliméricas por possuírem lipídio sólido em sua composição. Estas apresentam como uma das maiores vantagens, alta biocompatibilidade e, conseqüentemente, boa tolerância in vivo. Diversos estudos têm sido realizados com esse tipo de nanopartículas (LIU *et al*, 2006).

Liu e colaboradores (2006) testaram a capacidade de liberação tópica de nanopartículas lipídicas sólidas contendo isotretinoína, sendo usado como lipídio sólido o PRECIROL ATO 5 (gliceril palmito-estearato). Nesse experimento, foram desenvolvidas várias formulações de NLS contendo isotretinoína com diferentes concentrações de surfactantes. Através de estudos de permeação com difusão em célula de Franz, os autores

puderam observar que todas as formulações, independente da concentração de surfactante, não foram detectadas no compartimento receptor, ou seja, *in vivo* as NLS não seriam absorvidas sistemicamente e sim, intensificariam o efeito de liberação na pele.

As microemulsões e nanoemulsões são consideradas formulações atrativas como sistemas para vetorização de fármacos. Em aplicações dérmicas, essas formulações aumentam a penetração do fármaco por interagir com o estrato córneo e alterar o rearranjo estrutural da membrana lipídica, atuando, assim, como intensificador da penetração. As nanoemulsões possuem habilidade de liberar maior quantidade de água e agentes aplicados topicamente, do que a água sozinha ou em outro veículo tradicional. Devido a isso, agem como um ótimo carreador para um fármaco pouco solúvel, através de sua capacidade de aumentar a solubilização (DERLE *et al*, 2006).

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, dispersões translúcidas de óleo em água estabilizadas por moléculas de surfactante ou co-surfactante, normalmente apresentando partículas de 100nm ou menos. A presença de surfactante e/ou co-surfactante no sistema torna a tensão superficial muito baixa. As vantagens das nanoemulsões começam desde a sua preparação, devido à formação espontânea, e incluem estabilidade termodinâmica, aparência transparente e elegante, intensificação da penetração através das membranas biológicas e baixa variabilidade na cinética do fármaco (SHAKEEL *et al*, 2007).

A administração de fármacos através de sistemas nanoestruturados pode ser realizada por diferentes vias como oral, parenteral, oftálmica e tópica. Entre essas, a via tópica tem sido alvo de grande interesse principalmente para administração de AINEs (TORCHILIN; 2007).

Muitos estudos têm comprovado a eficácia e a adequação da via tópica para esse fim, pois, dessa forma, os efeitos adversos de primeira passagem causados pela administração oral podem ser evitados (DERLE *et al*, 2006).

Alguns sistemas nanoestruturados podem promover um perfil oclusivo do fármaco, e o fato de não haver absorção e distribuição sistêmica do ativo torna esses sistemas atrativos no tratamento de inflamação local da pele e nos estados de inflamação e dor de estruturas de suporte do corpo, como ligamentos, articulações, tendões e músculos, pois, nesses casos, é desejado que o fármaco não seja absorvido sistemicamente, mas que desempenhe atividade terapêutica no local da aplicação (SHAKEEL *et al*, 2007).

Formulações tópicas semissólidas contendo nimesulida em nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões foram testadas por Alves e colaboradores (2007) com o objetivo de avaliar a influência da composição e do tipo de estrutura dos diferentes nanocarreadores na penetração da nimesulida na pele humana. A partir de experimentos de permeação *in vitro* os autores

concluíram que o polímero utilizado no desenvolvimento dos sistemas nanocarreadores influencia na permeação do fármaco, pois somente as formulações que continham o polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona), dentre formulações com diferentes tipos de polímero, apresentaram retenção no estrato córneo.

O número de pesquisas com AINEs em sistemas nanoestruturados para aplicação tópica têm aumentado extensivamente nos últimos anos. Em um estudo recente com sistemas carreadores contendo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com flurbiprofeno demonstraram, mais uma vez, as potencialidades dos AINEs em sistemas nanocarreadores para administração na pele. Para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* os autores usaram o modelo de edema de pata de rato, induzido por carragenina. As formulações contendo o fármaco nanoestruturado foram administradas topicamente nos animais. Ambas formulações (NLS e CLN), não só inibiram o edema com grande magnitude, como também sustentaram essa inibição. A formulação contendo NLS de flurbiprofeno apresentou 78.2% de inibição do edema na 8ª hora do experimento e 60% dessa inibição foi mantida após as 8 horas. Após 24 horas, ainda foi possível observar uma atividade sustentada de 35%. Nos animais tratados com CLN a inibição foi de 86.6% na 8ª hora. Após as 8 horas, a atividade manteve-se em 70% e 24 horas depois, em 45%, demonstrando a liberação sustentada a partir do nanocarreador (BHASKAR *et al*, 2009).

Formulações com carreadores ultradeformáveis (Diractin<sup>®</sup>) contendo cetoprofeno foram investigados por Cevc e Blume (2008) com o objetivo de comparar a capacidade de permeação desses nanocarreadores com o produto comercial contendo o fármaco livre para administração tópica (Gabrilen<sup>®</sup>). Biópsias da pele de porcos, tratados *in vivo*, demonstraram uma rápida difusão do fármaco na forma livre para o tecido muscular, enquanto o cetoprofeno na forma nanoestruturada ficou retido na pele. Os autores concluem que esses sistemas contendo nanocarreadores ultradeformáveis apresentam uma ação eficiente para aplicação tópica de AINEs, em virtude do acúmulo de fármaco no local da aplicação, promovendo um efeito reservatório do mesmo.

Nanopartículas poliméricas contendo minoxidil foram investigadas por Shim e colaboradores (2004) através de estudos de permeação *in vitro* e de administração tópica *in vivo*, com o objetivo de observar se o tamanho da partícula apresentava influência na penetração e liberação do fármaco. Foram desenvolvidas formulações contendo nanopartículas com tamanhos de 40 e 130nm. O estudo de permeação demonstrou que foi detectada uma concentração de fármaco de 23% das nanopartículas de 40nm e 13% das

nanopartículas de 130nm no compartimento receptor da células de Franz. Esse dado sugere que o pequeno tamanho facilitou a maior penetração do minoxidil no compartimento receptor.

Um estudo realizado por Shah e colaboradores (2007) testaram a eficácia do uso tópico de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) contendo tretinoína, fármaco usado para o tratamento de várias doenças proliferativas da pele, em comparação com o produto comercial contendo o fármaco livre (Retino - A<sup>®</sup> cream). Foram realizados estudos *in vivo*, com ratos, para a determinação do grau de irritação da pele, a partir da avaliação do eritema desenvolvido. Esse experimento demonstrou que a administração tópica da formulação contendo o fármaco nanoestruturado resultou em considerável diminuição da irritação da pele quando comparado com a administração do fármaco na forma livre. Constituinto, assim, uma alternativa para pacientes com pele sensível e com baixa tolerância ao fármaco.

Dentre os estudos realizados com nanocarreadores, pode-se citar uma pesquisa feita por Puglia e colaboradores (2008) onde foram realizados estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com formulações contendo carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) de cetoprofeno e naproxeno comparados com formulações contendo o fármaco na forma livre. A inclusão de óleos no estado líquido (Miglyol<sup>®</sup>,  $\alpha$ -tocoferol e outros) beneficiou o desenvolvimento da formulação com os NLC e intensificou a liberação dérmica e transdérmica. O óleo, devido ao seu estado líquido, pode controlar a liberação total de fármaco, comportando-se como agente redutor da cristalinização das partículas, conferindo melhor estabilidade e tornando a formulação adequada quanto ao controle do perfil da liberação do ativo.

Nesse estudo, a atividade anti-inflamatória foi determinada *in vivo* através de um experimento com eritema induzido por UVB. O efeito terapêutico da formulação foi determinada pela capacidade da formulação de inibir o eritema após aplicação tópica preventiva. As formulações com o fármaco na forma livre foram capazes de inibir o eritema somente na primeira hora do experimento, enquanto o fármaco na forma nanoestruturada apresentou ação em 3-6 horas de experimento. Os resultados encontrados pelos autores confirmam o grande potencial dos NLC como carreadores de fármacos para administração tópica.

Dubey e colaboradores (2007) realizaram um estudo com lipossomas etanólicos (etossomas) contendo metotrexato em comparação com o fármaco lipossomado. Através dos estudos de permeação *in vitro*, foi possível observar um aumento significativo de fármaco retido na pele quando liberado através dos lipossomas etanólicos. A partir dos lipossomas convencionais, a concentração do fármaco na pele foi de, aproximadamente, 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,



enquanto que, quando os lipossomas etanólicos foram empregados, a concentração foi de, aproximadamente,  $1300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Entre os inúmeros estudos realizados para determinação da atividade anti-inflamatória de AINEs em sistemas nanoestruturados está uma pesquisa realizada por Manosroi e colaboradores (2008) na qual foi testada a atividade anti-inflamatória de um gel com niossomas elásticos contendo diclofenaco em comparação com uma formulação contendo o fármaco em niossomas convencionais. O modelo de indução de edema de pata por etilfenilpropiolato (EPP) foi usado para determinar a atividade anti-inflamatória, e o volume da pata foi medido em intervalos de 15 minutos, num total de 60 minutos. Ao final do experimento, foi possível observar que a formulação que continha o fármaco em niossomas elásticos foi capaz de inibir o edema da mesma forma que os niossomas convencionais (em torno de 39% de atividade anti-inflamatória) nos primeiros 15 minutos do experimento. Porém, na quarta determinação do volume da pata, aos 60 min, o índice de atividade anti-inflamatória dos niossomas elásticos foi de 18,92%, enquanto os niossomas convencionais apresentaram uma atividade de apenas 2,70%. Os autores concluem, por fim, que o desenvolvimento desse gel com niossomas elásticos pode oferecer uma formulação promissora como tratamento não invasivo tópico da inflamação.

## 2.6 VIA TÓPICA PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

A pele humana é composta por três camadas de tecidos: a epiderme celular, estratificada e avascular; a derme subjacente, formada por tecido conectivo e a gordura subcutânea ou hipoderme (AULTON, 2005) (Fig. 4). O tecido cutâneo é constituído por, aproximadamente, 70% de água, dividida de forma variada, sendo a hipoderme a mais hidratada (HERNANDEZ, 1999).

A pele é o maior órgão do corpo, representando 16% do peso corporal. Funções importantes são atribuídas a ela como: proteção, recepção de estímulos sensoriais, informações imunológicas, funções metabólicas como produção de vitamina D (colecalférol), auxílio na homeostasia e na termorregulação (SILVA *et al.*, 2007).

A epiderme possui uma espessura de, aproximadamente, 0,07 a 1,2 mm, variando conforme a região do corpo, podendo chegar até 0,8 mm na palma das mãos e 1,4 mm na planta dos pés (SCHÄFER-KORTING *et al.*; 2007).

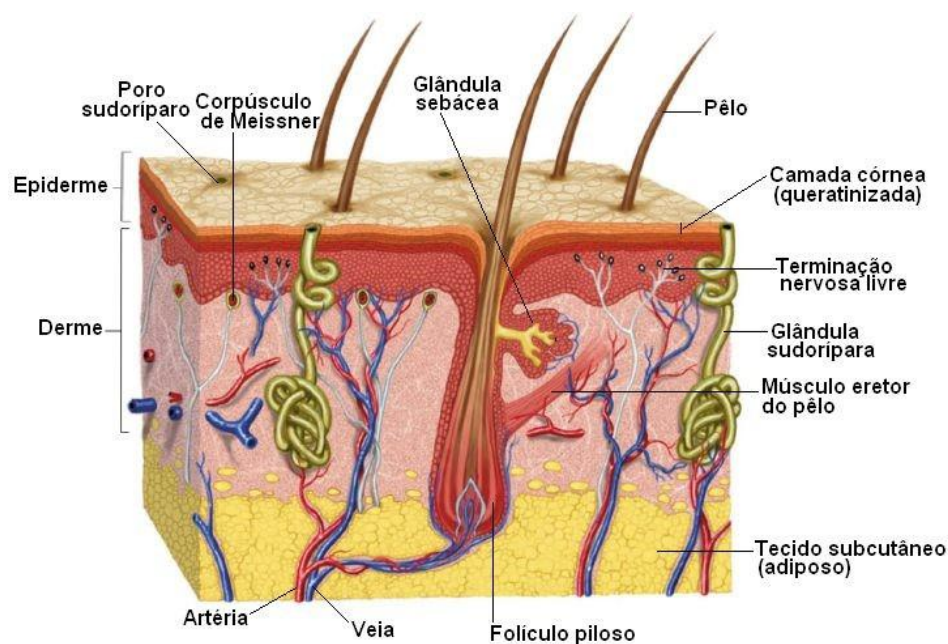


Figura 4 – Estrutura básica da pele (adaptado de AZULAY E AZULAY, 2006).

Os quatro tipos de células que constituem a epiderme são: os queratinócitos, muito numerosos e com características peculiares, dividem-se em cinco camadas, desde a profundidade até a periferia (camada basal germinativa, camada filamentosa de Malpighi, camada granulosa, camada clara ou lúcida e camada córnea) (Fig. 6); os melanócitos, células grandes, com dendritos, as quais possuem os melanossomos, responsáveis pela síntese de melanina; as células de Langerhans, células dendríticas, móveis que se deslocam entre a derme e a epiderme; e as células de Merckel, situadas no nível da camada basal germinativa, unidas aos queratinócitos por desmossomos participando da inervação da pele (HERNANDEZ; 1999).

A camada basal germinativa, a mais profunda da epiderme, é responsável pela contínua substituição dos queratinócitos (SILVA *et al*, 2007). As células da camada basal (estrato germinativo) dividem-se e migram ascendentemente para produzirem o estrato córneo ou camada córnea (AULTON; 2005).

A camada filamentosa, também chamada espinhosa possui células que começam a se achatar e tomam uma forma poliédrica, sendo repartidas em três ou quatro subcamadas (Hernandez, 1999). Os queratinócitos mais basais dessa camada também são mitoticamente ativos; juntas, a camada basal e a filamentosa, são denominadas camada de Malpighi (SILVA *et al*, 2007).

Na camada granulosa as células têm forma de losango, consideravelmente achatadas e divididas em três subcamadas, e o núcleo está em via de degeneração. O aspecto granuloso é devido à presença de grãos de queratoialina, precursora de uma proteína chamada filagrina, que irá aumentar a resistência da queratina e se decompor numa mistura de aminoácidos, dando origem ao Fator de Hidratação Natural (FHN) (HERNANDEZ, 1999). As células da camada granulosa também possuem grânulos revestidos por uma membrana, denominados corpos lamelares. Esses grânulos são constituídos de lipídios e enzimas hidrolíticas. Essas substâncias são liberadas dos corpos lamelares por exocitose no espaço extracelular (entre a camada granulosa e a córnea). Dessa forma, cobrindo a membrana das células córneas, formam lâminas lipídicas. Os corpos lamelares são responsáveis pela retenção de água e nutrientes provenientes da derme, provocando a morte celular dos queratinócitos adjacentes (SILVA *et al*, 2007).

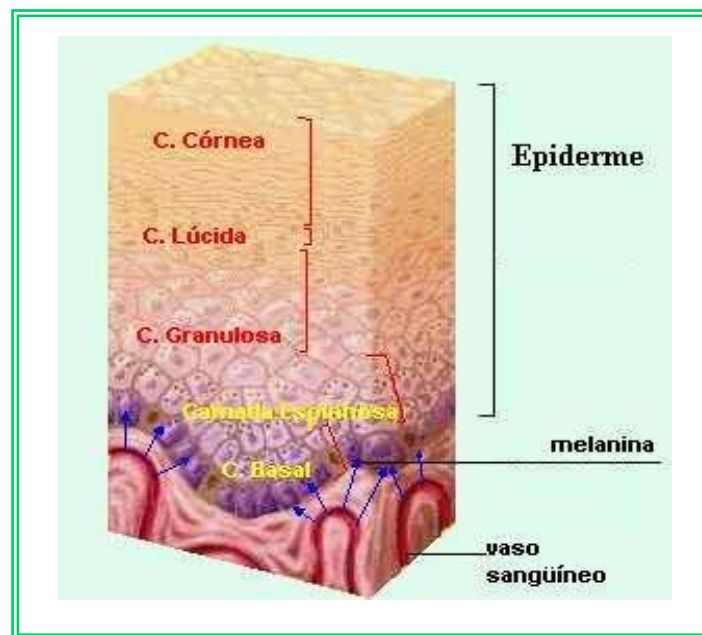


Figura 5 – Estrutura da epiderme (adaptado de WHITTE, 2000).

A camada clara ou lúcida não é visível em todas as regiões corporais. É observada, principalmente, nas áreas sem pêlos, como a superfície palmar e plantar, apresentando-se como uma camada fina e translúcida (SILVA *et al*, 2007). As células dessa camada são achatadas, compactadas, dispostas sobre um ou dois estratos. Contém uma substância lipoproteica, a eleidina (HERNANDEZ; 1999), proveniente da conversão de parte da

queratoialina, que permite o deslizamento da camada córnea sobre a camada clara (SILVA *et al*, 2007).

A camada córnea é constituída por células completamente queratinizadas, sem núcleo, que formam “lâminas”. Estas células perdem suas organelas intracelulares, tais como, núcleo, mitocôndrias e ribossomos, sob a ação de enzimas lipossomais (HERNANDEZ;1999). O estrato córneo funciona também como uma barreira microbiológica, e a perda dos corneócitos (células que descamam) junto com os micro-organismos ali aderidos, auxilia o mecanismo protetor (AULTON, 2005). As células mais internas da camada córnea (células córneas) continuam conectadas por desmossomos, e as células mais superficiais (células escamosas ou corneócitos) perdem os desmossomos e se desprendem da pele (SILVA *et al*, 2007). A camada córnea é formada por cerca de quinze subcamadas de corneócitos achatados. A espessura de cada subcamada é em torno de 220 a 400 nm, enquanto que a espessura do total da camada córnea é em torno de 5 a 8  $\mu\text{m}$  (SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007).

No estágio inicial de diferenciação do estrato córneo, a composição lipídica difere das outras camadas mais profundas da epiderme devido ao desaparecimento da porção fosfolipídica, enquanto que as ceramidas, os ácidos graxos e o colesterol aumentam. Nesse caminho, os lipídios intercelulares são enzimaticamente modificados para diminuir sua polaridade, e o fator natural de hidratação (FNH) é produzido. Essa transformação dos lipídios promove a pele uma barreira lipídica impermeável. A fluidez da membrana (e assim a passagem de substâncias) depende dos tipos de lipídios presentes e da estrutura entre eles. A membrana pode ser mais elástica (mais permeável e fluida) quando possui mais ácidos graxos insaturados, e mais rígida (menos permeável e menos fluida) se ácidos graxos saturados e colesterol prevalecerem. Por essa razão, a camada granulosa e especialmente a camada córnea, possuem altos níveis de ceramidas e colesterol, que aumentam a rigidez da membrana (MORGANTI *et al*, 2001).

O estrato córneo é tão fino, quando comparado com a maioria das áreas corporais, que não protege efetivamente os tecidos vivos subjacentes de extremos de frio e calor, não sendo um isolante térmico eficiente (AULTON; 2005). A função da camada córnea na conservação da hidratação cutânea é dupla: funciona como barreira hidrofóbica, assegurada pelas células queratinizadas, e função de fixação de água, graças às substâncias higroscópicas que constituem o fator natural de hidratação (FHN) (HERNANDEZ;1999). A camada córnea previne a penetração de compostos hidrofílicos mais eficientemente do que de compostos lipofílicos (SCHÄFER-KORTING *et tal*, 2007). O estrato córneo é a principal barreira para

muitos compostos passarem através da pele. Inúmeras alternativas têm sido desenvolvidas para permear essa barreira (MANOSROI *et al*, 2008).

A derme, ou cório, consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas que são embebidas em uma substância de fundo, amorfa, composta por mucopolissacarídeos (AULTON.; 2005). Na derme situam-se os anexos da pele, como os pêlos. Essas estruturas são originadas pela epiderme por intermédio de brotos epiteliais iniciados na camada basal; esses brotos invadem a derme durante a embriogênese, desenvolvem-se e permanecem na área dérmica (SILVA *et al*, 2007).

A derme é o elemento de sustentação e nutrição da epiderme e seus anexos. Contém entre 20% e 40% da água total do corpo (HERNANDEZ; 1999). É um tecido conjuntivo dividido em duas partes: derme superficial ou papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo com presença de numerosas fibras dirigidas verticalmente, é vascularizada e inervada; e a derme profunda ou reticular, formada por tecido conjuntivo denso, onde as fibras de colágeno e elastina se entrelaçam paralelamente à superfície cutânea, é igualmente vascularizada e inervada. Neste segundo nível, é onde se encontram as glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos pilosos (SILVA *et al*, 2007).

A hipoderme é um tecido subcutâneo que une a derme aos órgãos profundos. É formada por tecido conjuntivo adiposo de espessura variável conforme sua localização (HERNANDEZ; 1999). Essa camada funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas rapidamente disponíveis (AULTON; 2005). Essa camada possui duas grandes funções: reserva de gorduras provenientes do fígado e do intestino e lipólise (metabolização da gordura estocada a ácidos graxos) (SILVA *et al*, 2007).

A pele apresenta muitas funções no corpo humano, uma delas é barrar a entrada de moléculas indesejadas do meio externo, enquanto controla a perda de água, eletrólitos e outros constituintes endógenos. A camada córnea é impermeável à maioria dos produtos químicos e, usualmente, contribui para o passo limitante da absorção transdérmica. A pele intacta é uma barreira muito efetiva, pois a resistência difusional da camada córnea é alta, e a rota alternativa dos apêndices permeáveis propicia apenas uma pequena área fracional (AULTON; 2005).

A absorção percutânea é o processo pelo qual uma substância, após ser aplicada na pele, difunde-se através das diversas camadas, podendo atingir a corrente sanguínea. A pele, órgão de proteção por excelência, seria uma improvável rota para administração de fármacos. Os processos evolutivos proporcionaram aos mamíferos uma cobertura externa cuja principal

função é atuar como barreira para evitar a perda de água, apresentando, por outro lado, uma notável resistência à absorção deliberada ou acidental, de substâncias ativas medicamentosas ou nocivas, dando aparecimento a efeitos terapêuticos ou mesmo tóxicos (FERREIRA; 2002).

A penetração de uma substância através da pele está associada a um certo número de dificuldades como: variabilidade na absorção percutânea de acordo com o local, estado patológico, idade e raça; capacidade reservatória da pele; irritação e/ou outras toxicidades causadas pela aplicação tópica de determinadas substâncias (MORGANTI *et al*, 2001).

Diferentemente da camada córnea, as outras camadas da pele, como a derme e a epiderme, não possuem propriedades de barreira. Por isso, a permeação através do estrato córneo é essencial para a absorção percutânea de agentes terapêuticos. Para passar através do estrato córneo, o soluto tem três caminhos, que podem ser classificados como: rota intercelular, na qual o soluto passa entre os corneócitos; rota intracelular, onde o caminho é através dos corneócitos e rota pelos apêndices da pele, que incluem os dutos de transpiração e os folículos pilosos (SHIM *et al*, 2004). Entretanto, poucos fármacos são capazes de difundir passivamente o estrato córneo, como resultado de sua propriedade efetiva de barreira (MORGANTI *et al*, 2001). Uma demonstração simples desse fato é que, se o estrato córneo for removido com uma fita adesiva, a permeabilidade de água e outros compostos aumenta drasticamente (MICHNIAK E ASBILL; 2000).

Os métodos de absorção percutânea incluem intensificação química da afinidade da formulação com os lipídios da pele, o qual irá fazer uma alteração física ou química na estrutura do estrato córneo; e sistemas de entrega, os quais são capazes de penetrar no estrato córneo. O uso de intensificadores químicos como surfactantes e solventes orgânicos, induzem irritação, causam dano e reduzem a função de barreira da pele. Já os sistemas de liberação de agentes terapêuticos não são agressivos, mantendo a função normal dessa barreira (MANOSROI *et al*, 2008).

Com o intuito de desenvolver um sistema que modifique os parâmetros de difusão do fármaco, tanto do veículo quanto na pele, a fim de reduzir a absorção sistêmica, Contreras e colaboradores (2005) realizaram um estudo com ácido retinóico encapsulado em lipossomas com lipídios do estrato córneo (SCLL). Nesse estudo foi usada a difusão em célula de Franz com pele abdominal de rato como membrana. Foram testados três tipos de formulações: ácido retinóico em hidrogel de carbopol; ácido retinóico em hidrogel de carbopol combinado com ácido hialurônico e ácido retinóico em SCLL. Nesse, experimento foi possível observar que a concentração de ácido retinóico difundido através da pele na formulação com SCLL foi significativamente menor que nas outras duas formulações. Os autores sugerem que, enquanto

lipossomas convencionais favorecem a permeação, SCLL favorecem a retenção no estrato córneo devido a sua composição lipídica.

Muitos estudos têm sido conduzidos no intuito de se desenvolverem formulações que possam vencer a barreira do estrato córneo. Uma das alternativas mais eficientes até o momento é uso de sistemas carreadores (MANOSROI *et al*, 2008). Nano e micropartículas têm sido intensamente investigadas para se realizar vetorização, liberação sustentada do fármaco (SCHAFFAZICK *et al*, 2003; ALVES *et al*, 2007), intensificação da absorção percutânea e redução de efeitos colaterais dos fármacos (SHIM *et al*, 2004).

Quando um fármaco é aplicado topicamente, este pode exercer sua ação no local da aplicação, ou seja, restringindo-se ao estrato córneo, ou penetrar até camadas mais profundas, como a derme. Nesse caso, em virtude da vascularização dessa camada – início da microcirculação periférica - o fármaco pode chegar à corrente circulatória, exercendo seu efeito de forma sistêmica (SHAKEEL *et al*, 2007).

A habilidade do fármaco em permear a pele e exercer a sua atividade terapêutica em formulações tópicas, depende de dois eventos consecutivos: o fármaco, primeiramente, deve ter a capacidade de difundir-se através do veículo até a pele e, após, ser capaz de permear a barreira cutânea (ALVES *et al*, 2007).

Micelas, lipossomas, micro e nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas são os principais representantes de carreadores para entrega de ativos que têm sido desenvolvidos, a fim de aumentar a absorção percutânea de agentes terapêuticos sem causar dano à barreira que constitui o estrato córneo (SHIM *et al*, 2004).

O mecanismo de ação das nanopartículas tem sido atribuído a sua associação com a superfície da pele. O pequeno tamanho da partícula assegura um estreito contato com o estrato córneo (BARRAT *et al*, 2000; ALVES *et al*, 2007). Entretanto, o mecanismo e a rota exatos da liberação dos ativos nanocarreados e sua absorção percutânea ainda não estão totalmente esclarecidos (SHIM *et al*, 2004).

A via tópica para administração de fármacos tem chamado cada vez mais a atenção dos pesquisadores. Esse aumento do interesse pela administração transdérmica pode ser atribuído às vantagens oferecidas por essa via de administração (MANOSROI *et al*, 2008), como: evitar a inativação enzimática associada com a passagem gastrointestinal; evitar metabolismo hepático de primeira passagem; obter diminuição da dose em comparação à forma farmacêutica oral e diminuição dos efeitos adversos (FERREIRA; 2002).

## 2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

### 2.7.1 Modelo *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina

Uma das técnicas mais comumente utilizadas para avaliar a atividade de fármacos anti-inflamatórios está baseada na habilidade de inibir o edema produzido na pata traseira de rato por injeção de um agente flogístico. Os materiais flogísticos mais frequentemente utilizados são carragenina, formalina, dextrano, albumina de ovo e lêvedo de cerveja (LE BARS *et al*, 2001).

O uso da carragenina como agente flogístico apresenta inúmeras vantagens, como eficácia em níveis não tóxicos, baixa variabilidade e produção de uma curva dose-resposta com fármacos de conhecida eficácia terapêutica (WINTER; 1963). O edema inflamatório induzido por carragenina - um polissacarídeo de algas da família das *Rhodophyceae* - é considerado um modelo padrão para ensaios de determinação da atividade anti-inflamatória de AINEs (VAJJA *et al*, 2004).

O método consiste em induzir edema na pata traseira esquerda do rato e compará-la com a pata contralateral, a qual é considerada o controle do ensaio. O edema é, então, expresso pela diferença de volume entre as patas, medido por pletismometria após um determinado período de tempo (WINTER;1963; BECK; 2000).

O pletismômetro é constituído por uma célula cilíndrica para a medida do volume da pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada também resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. O aparelho converte, então, o deslocamento do líquido em volume (BACELLI *et al*, 2004)

Vários pesquisadores têm utilizado esse modelo para avaliação de fármacos com atividade anti-inflamatória, dentre eles, Pohlmann e colaboradores (2007) avaliaram a atividade anti-inflamatória de nanoesferas contendo indometacina em comparação com o fármaco livre através do edema de pata induzido pela carragenina. Nesse estudo foi possível demonstrar maior inibição do edema pela formulação contendo o fármaco em nanoesferas, comparado com o fármaco na forma livre.



### 2.7.2 Modelo *in vivo* de indução de artrite por *Adjuvante de Freud*

A indução de artrite por *Adjuvante Completo de Freud* (FCA) em ratos é um modelo utilizado para determinações qualitativas e quantitativas da atividade anti-inflamatória. Esse modelo propicia condições clínicas e histológicas similares a osteoartrite humana e tem sido comumente usado em ensaios em que se deseje produzir dor e inflamação reumáticas (HEGEN *et al*, 2008).

O FCA pode consistir de diferentes combinações de substâncias. A mais comum é uma mistura de óleo mineral não metabolizável, um surfactante e uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*). Essa combinação tem sido usada há muitos anos e é considerada a mais efetiva para intensificar uma resposta imunológica a um antígeno (HEGEN *et al*, 2008).

Um estudo realizado por Gupta e colaboradores (1996) avaliou a atividade anti-inflamatória de três AINEs: nimesulida, diclofenaco e piroxicam, através do método de artrite, aguda e crônica, induzida por Adjuvante de Freud. A atividade anti-inflamatória foi determinada pela capacidade do fármaco de inibir a formação do edema. O índice de inibição no modelo de artrite aguda para nimesulida, diclofenaco e piroxicam foi de 36.47, 30.47 e 24.70%, respectivamente. A inibição do edema na artrite crônica foi de 52.78, 30.47 e 24.70%. Nesse estudo, a nimesulida demonstrou uma maior capacidade de inibir o desenvolvimento de artrite tanto na fase crônica quanto na fase aguda, apresentando um efeito mais pronunciado nesta última.

Em virtude dos inúmeros efeitos colaterais associados ao uso oral da nimesulida, a aplicação tópica desse fármaco em sistemas nanoestruturados pode diminuir a dose oral administrada, bem como prevenir esses efeitos adversos em virtude da liberação direcionada oferecida pelos nanocarreadores (DERLE *et al*, 2006).

### 2.7.3 Modelo *in vivo* de indução da formação de tecido granulomatoso

A formação de granuloma pela implantação de *pellets* de algodão em ratos é outro método utilizado o qual apresenta reprodutibilidade confiável para avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios, em razão da capacidade do cilindro implantado de interferir com os componentes proliferativos do processo inflamatório (BAILEY *et al*, 1982).

Os passos envolvidos na formação do granuloma no local do implante do cilindro envolvem inicialmente, acúmulo de fluido e material protéico, com infiltração de neutrófilos.

O granuloma, ao final do sexto dia, é caracterizado pela formação de cápsula fibrosa vascularizada, contendo fibroblastos e células mononucleares infiltrantes. Dessa forma, os resultados são interpretados de forma que, quanto menor a cápsula fibrosa desenvolvida, mais intenso é o efeito anti-inflamatório do fármaco testado (BAILEY *et al.*; 1982; DALMORA *et al.*, 1996).

Esse modelo vem sendo utilizado quando se deseja avaliar a atividade de um determinado fármaco sobre um processo inflamatório crônico. Com esse intuito, Bastos e colaboradores (2007) realizaram um estudo usando essa metodologia para determinar a atividade anti-inflamatória de minociclina e doxiciclina, ambas tetraciclinas de segunda geração, quando foi possível observar uma inibição significativa da formação do tecido granulomatoso para os dois fármacos em relação ao controle. Foram testadas doses de 50 e 100 mg/Kg, aplicadas diariamente por injeção intraperitoneal, durante 6 dias. Foi usada dexametasona (1mg/Kg) como controle positivo. Ambas as concentrações de ambos os fármacos foram capazes de inibir de forma significativa a formação de tecido fibrovascular.

#### 2.7.4 Modelo *in vivo* de cicatrização

Um dos métodos comumente utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de fármacos é o modelo de cicatrização em ratos. Este método baseia-se na indução de uma lesão no dorso do animal, provocada por incisão cirúrgica, sob condições assépticas, sendo removida uma área de pele de 1,5 x 1,5cm. Após esse procedimento, o animal começa a ser tratado com aplicações tópicas do fármaco em estudo (DEGIM *et al.*, 2002).

A cicatrização de feridas é um complexo processo multifatorial que resulta em contração periférica da lesão e posterior restauração da função de barreira da pele. O reparo do tecido lesado advém de uma sequência de eventos, que inclui inflamação, proliferação, migração de diferentes tipos de células, produção de matriz extracelular e remodelamento do tecido (DEGIM *et al.*, 2002). Em virtude da produção de agentes pró-inflamatórios, há, também, a geração de EROs, os quais apresentam um efeito deletério no processo de cicatrização, devido ao seu efeito nocivo às células e aos tecidos. A aplicação tópica de substâncias com atividades anti-inflamatória e antioxidante é capaz de promover um aumento significativo no processo de cicatrização da ferida além de proteger o tecido do dano oxidativo (PATTANAYAK E SUNITA, 2008).

Em virtude do processo inflamatório desencadeado pela indução da lesão, há expressão da enzima ciclo-oxigenase – 2 (COX-2) e conseqüentemente, a liberação de mediadores químicos como as prostaglandinas. O papel da COX-2 na patogênese de lesões epidérmicas tem sido uma importante área de pesquisa. O interesse nesse campo dá-se no intuito de promover maior conhecimento do mecanismo de ação local dos fármacos comumente usados e seus efeitos anti-inflamatórios. O papel da COX-2 como mediadora dos processos inflamatórios na pele tem sido observado em inúmeros modelos animais. A administração tópica de inibidores da COX-2 em inflamações de pele tem demonstrado ser capaz reduzir ou inibir o edema, a permeabilidade vascular e a produção de mediadores inflamatórios cutâneos. Acredita-se que a administração tópica de inibidores da COX-2 pode ser usada como forma de tratar lesões de pele que sejam mediadas por essa enzima (LEE et al, 2003).

O modelo de cicatrização de lesão induzida apresenta como vantagem possibilitar a determinação de mais de um parâmetro da atividade do fármaco. Em virtude da área da lesão ser periodicamente medida durante o experimento, ao final do qual pode-se obter a diferença de área em relação ao início e ao término do estudo, permitindo observar a eficácia do fármaco testado no processo de cicatrização da ferida. Além disso, esse modelo possibilita, também, análises *ex vivo*. Ao final do experimento, os animais são sacrificados e a área da lesão, já em processo de regeneração, pode ser removida, e, a partir dela, podem ser realizadas inúmeras análises, como dosagem de produtos da peroxidação lipídica e da peroxidação proteica, além de permitir que sejam analisados os aspectos histológicos do tecido (MOURA; 2004).

Inúmeros estudos usam essa técnica para determinar a atividade antioxidante dos mais diversos compostos, como novos fármacos, substâncias tóxicas exógenas e endógenas, hormônios, extratos de plantas, entre outros. Pattanayak e Sunita (2008) realizaram um estudo com o extrato de *Dentrophthoe falcata* (L.f) a 5 e 10%. Essa planta é comumente usada para vários fins medicinais, como tratamento de úlceras, asma, impotência, doenças de pele, cicatrização de feridas, entre outros. Através do modelo de cicatrização de ferida induzida do dorso de ratos, os autores observaram uma potente ação cicatrizante do extrato estudado, após 18 dias de tratamento, quando houve uma redução da área da lesão inicial de, aproximadamente, 530 mm<sup>3</sup> para 32 mm<sup>3</sup> com o extrato a 5%. Já com o extrato a 10%, a área da lesão foi totalmente cicatrizada.

## 2.8 MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

### 2.8.1 Determinação da atividade *in vitro* através da técnica de captação do radical 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH)

Dentre os diversos métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*, um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, o qual absorve em comprimento de onda de 515 a 518 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando o 2,2-difenil-picril-hidrazina, de coloração amarelo-alaranjada, com conseqüente diminuição da absorção, permitindo, dessa forma, o monitoramento da atividade pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados, determina-se a percentagem de atividade antioxidante. Essa percentagem corresponde à quantidade de DPPH consumida pela substância antioxidante. Quanto maior for o consumo de DPPH pela substância, maior será sua atividade antioxidante (CANDELARIO-JALIL, 2008).

Inúmeros estudos que visam avaliar a atividade antioxidante de diversas substâncias fazem uso da técnica do DPPH, entre eles, uma pesquisa realizada por Pereira (2008) na qual foi analisada a atividade antitumoral do celecoxibe em ratos submetidos a um modelo de indução de câncer. Uma das hipóteses da autora para a atividade anti-tumoral do fármaco, seria sua atividade antioxidante. Através da técnica do DPPH, foram testadas amostras do fármaco em solução nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml. A partir dos resultados obtidos, a autora concluiu que o fármaco não apresentou atividade antioxidante, atribuindo-se sua atividade antitumoral a outro fator.

A técnica do DPPH é bastante utilizada para a determinação de atividade antioxidante de extratos de plantas medicinais. Dentre esses estudos, cita-se uma pesquisa realizada por Souza e colaboradores (2007) em que foi testada a capacidade de sequestrar radicais livres de cinco plantas medicinais brasileiras. Usando como padrão o ácido gálico – uma substância de atividade antioxidante conhecida - os autores puderam obter resultados precisos e satisfatórios com o método citado, no qual os extratos etanólicos de duas das plantas analisadas demonstraram uma percentagem de atividade antioxidante em torno de 80 a 90% na concentração de 100µg/ml, enquanto as demais não apresentaram o mesmo comportamento.

Embora a literatura seja deficiente em estudos para a avaliação da atividade antioxidante de AINEs através da técnica do DPPH, esse método é considerado eficiente e apresenta boa reprodutibilidade (CANDELARIO-JALIL, 2008).

## 2.9 MODELOS EXPERIMENTAIS *EX VIVO*

2.9.1 Determinação da atividade antioxidante *ex vivo* através da técnica de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances*)

Inúmeros estudos têm sido conduzidos com o intuito de avaliar a peroxidação lipídica em sistemas biológicos e, conseqüentemente, encontrar uma alternativa para minimizar ou evitar os danos causados pela produção excessiva de radicais livres em condições patológicas. Os principais métodos *in vivo* e/ou *ex vivo* utilizados para determinação/quantificação da peroxidação dos lipídeos de membrana medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases desse processo (KHANDUJA *et al*, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas para a avaliação *in vivo* e/ou *ex vivo* da oxidação de lipídeos de membrana é o doseamento do malondialdeído (MDA), uma das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) por cisão *beta* dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido aracdônico. O MDA é volátil, possui baixo peso molecular e é um ácido moderadamente fraco ( $pK_a = 4,46$ ). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos, para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção no visível ou por fluorescência (BENZIE, 1996; LIMA E ABDALLA *et al*, 2001).

Degim e colaboradores (2002) realizaram experimentos de cicatrização com modelo animal com ratos, por indução de lesão dorsal, quando foi avaliada a atividade cicatrizante e antioxidante de um gel contendo taurina e quitosana, em comparação com gel contendo somente quitosana. Após o experimento de cicatrização, os animais foram sacrificados e a área da lesão que foi tratada durante o experimento, logo em seguida foi removida, e os níveis de malondialdeído (MDA) foram dosados através da técnica *TBARS*. No tecido da lesão a qual foi tratada com gel contendo somente quitosana os níveis de MDA foram, aproximadamente, 510 nmol/g tecido, enquanto que com o gel contendo quitosana e taurina esses níveis decrescem para, aproximadamente, 280 nmol/g tecido. Os autores concluíram que o gel contendo quitosana e taurina demonstrou uma significativa redução do estresse oxidativo, em virtude dos baixos níveis de MDA.

Utilizando o mesmo modelo, Pattanaiaik e colaboradores (2008), após a realização de experimento de cicatrização, os animais foram sacrificados, a área tratada removida e o total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi doseado a fim de determinar o estresse oxidativo. Os autores puderam observar uma significativa atividade antioxidante do extrato de *Dendrophthoe falcata* (L.f). Nos animais tratados com o extrato da planta a 5% o nível *TBARS* foi de 1.01 nmols/mg proteína e no extrato a 10% foi de 0,82 nmols/mg proteína, comparados com o controle (1,34 nmols/mg proteína).

Este é um dos métodos mais utilizados, tanto *in vivo* quanto *in vitro* para avaliação do estresse oxidativo. A partir da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, é possível avaliar a peroxidação lipídica causada pela geração excessiva de radicais livres. Em virtude da presença desses radicais durante um processo inflamatório, a técnica de *TBARS* é de grande valia, principalmente nos estudos específicos com a nimesulida, a qual apresenta, além da reconhecida atividade anti-inflamatória, também atividade antioxidante, atuando não só através da inibição da cascata do ácido aracdônico, mas também de forma a reduzir os possíveis danos nos tecidos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Matérias-primas, solventes, reagentes e outras substâncias

- Acetona P.A. – Nuclear;
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) – Nuclear;
- Adjuvante de Freud - Sigma – Farma;
- Água MilliQ®
- Álcool etílico P.A. – Nuclear;
- Anasedan Injetável (Xilazina) - Sespo /Divisão Vetbrands Saúde Animal.
- Carbopol 940® - Polímero de ácido acrílico – Henrifarma;
- Carragenina Sigma – Farma;
- Dopalen Injetável (Ketamina) - Agribands do Brasil Ltda;
- DPPH – Sigma – Farma;
- Éter etílico – Nuclear;
- Hidroximetil aminometano (Tampão Tris HCl) – Sigma;
- Lauril sulfato de sódio P.A (SDS) – Sigma;
- Metilparabeno - Alpha Química;
- Monoleato de sorbitano (Span 60®) - Sigma – Aldrich;
- Nimesulida – Henrifarma;
- Poli (ε- caprolactona) P.M. 80.000 - Sigma – Aldrich;
- Polissorbato 80 (Tween 80®) - Sigma – Aldrich;
- Propilenoglicol - Alpha Química;
- Propilparabeno - Alpha Química;
- Ratos machos Wistar - Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM;
- Solução Ornano Imbibende UGO BASILE – Itália;
- Sorbitol – Sigma Aldrich;
- Trietanolamina - Via Farma;
- Triglicerídio de ácido cáprico e caprílico (Mygliol 810®) – Viafarma;

### 3.1.2 Equipamentos e utensílios

- Agulhas – BD Plastipak;
- Balança analítica AX 200 – Shimadzu;
- Bisturi – Skay;
- Caixa de aço inox para esterilização – Met. Fava;
- Chapa de aquecimento – Fisaton;
- Espectrofotômetro UV – VIS 1650 PC – Shimadzu;
- Estufa – Nova ética;
- Evaporador rotatório 801 – Fisaton;
- Fio de sutura de *nylon* – Med Suture – MED Goldman;
- Lâminas para bisturi – Med blade – Med Goldman;
- Pinça - Erwin Guth;
- Pletismógrafo UGO BASILE 7140 - Itália
- Porta-agulha - Erwin Guth;
- Seringas – BD Plastipak;
- Tesoura – Erwin Guth;
- Zetasizer<sup>®</sup> – Nano-ZS – Malvern.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparação das nanopartículas

As nanocápsulas de nimesulida foram preparadas através do método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (Fessi *et al*, 1998), desenvolvidas e caracterizadas por Alves e colaboradores (2005). A concentração final de nimesulida foi 1,5 mg/ml de suspensão. A fase orgânica constituiu-se de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (1g), Mygliol 810<sup>®</sup> (3,102 ml), nimesulida (0,150 g), acetona (267 ml) e monoestearato de sorbitano (0,766 g). Todos os componentes da fase orgânica foram colocados em um béquer, em banho-maria, e mantidos à temperatura de 40 °C, sob contínua e moderada agitação magnética. A fase orgânica foi vertida a uma solução aquosa contendo polissorbato (0,766 g) em 533 ml de água, igualmente mantida em banho-maria, a 40 °C, sob moderada e contínua agitação magnética. Após a adição das duas fases, a suspensão foi mantida sob as mesmas condições de temperatura e



agitação por 10 minutos. O solvente foi evaporado em rotavapor, e o volume final da formulação foi ajustado para 100ml.

### 3.2.1.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo nimesulida

A determinação das características físico-químicas da suspensão de nanopartículas contendo nimesulida foi realizada com o objetivo de comparar os dados encontrados neste estudo com os resultados obtidos anteriormente por Alves e colaboradores (2005). A suspensão foi analisada com relação ao diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

#### 3.2.1.1.1 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão

As determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão da suspensão de nanopartículas foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico - Zetasizer<sup>®</sup> Nano-ZS (Malvern). A suspensão foi analisada sem diluição, à temperatura ambiente. Os resultados foram determinados a partir da média da análise em triplicata.

#### 3.2.1.1.2 Potencial Zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese. Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (v:v) das suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm. Os resultados foram obtidos a partir da média da análise em triplicata.

#### 3.2.1.2 Preparação das formulações semissólidas

As suspensões de nanocápsulas (NC) contendo o fármaco foram incorporadas em bases de géis com caráter hidrofílico. Também foram utilizadas formulações, incorporando-se o fármaco na forma livre. Uma suspensão contendo nanocápsulas vazias, incorporada no hidrogel (GHNCV), foi usada como controle nos experimentos. Os componentes das formulações de gel hidrofílico (GHN) estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Componentes das formulações dos géis hidrofílicos contendo nimesulida na forma livre (GHN), na forma nanoencapsulada (GHNCN) e contendo nanocápsulas vazias (GHNCV).

<b>Componentes</b>	<b>GHN</b>	<b>GHNCN</b>	<b>GHNCV</b>
Dispersão de Carbopol 940® a 6%	4,0 g	4,0 g	4,0g
Solução conservante metilparabeno/propilparabeno	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Sorbitol	5 ml	5 ml	5 ml
Trietanolamina	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Dispersão de nimesulida	1,5 mg	-----	-----
Suspensão de nanocápsulas contendo nimesulida (1,5 mg/ml)	-----	89 ml	
Água qsp	100 ml	-----	100ml

Para a preparação do gel contendo o fármaco livre, os componentes foram homogeneizados em um gral (nimesulida, polissorbato 80, monoestearato de sorbitano e sorbitol) e aquecidos até a completa fusão dos componentes. Em outro gral, a dispersão de carbopol, a trietanolamina, a solução conservante e a água, foram homogeneizadas. Após este procedimento, ambas as preparações foram unidas, homogeneizadas e transferidas para recipientes específicos. Para a preparação do hidrogel contendo o fármaco nanoestruturado, foi usada a suspensão com nimesulida em nanocápsulas, enquanto que, para o gel com fármaco livre, a suspensão foi substituída pela água.

### 3.2.2 Estudos *in vivo*

Para realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados ratos machos adultos Wistar, com pesos entre 200 e 250 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, com água e ração à vontade e com ciclo de 12 horas de claro-escuro por, no mínimo, três dias antes de cada experimento. Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com normas pré-estabelecidas para testes com modelos de animais, após aprovação pelo Comitê de Ética e

Bem Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, sob Processo nº 23081.002582/2008-77.

### 3.2.2.1 Modelo de indução de edema de pata pela carragenina

A atividade anti-inflamatória foi determinada de acordo com o método de Winter e colaboradores (1962), Gupta e colaboradores (1996) e Le Bars e colaboradores (2001) com algumas adaptações. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, em três grupos de seis animais. O primeiro grupo foi considerado como controle, e os outros foram tratados. Nos grupos que receberam tratamento, o fármaco foi administrado topicamente, friccionando-se por 30 segundos, 50 mg de cada formulação, 1 hora antes da injeção subplantar de carragenina na pata traseira direita de cada rato. Cada grupo recebeu, respectivamente, géis contendo nimesulida incorporada em nanocápsulas e na sua forma livre. O grupo controle recebeu gel contendo nanocápsulas vazias. O edema foi medido através de pletismografia, 3 horas após a injeção de carragenina.

### 3.2.2.2 Modelo de indução de artrite por *Adjuvante de Freud*

O método foi seguido como descrito por Brand (2005) com algumas adaptações. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, em três grupos de seis animais. O primeiro grupo serviu como controle, os demais foram tratados. A artrite foi induzida por injeção de 0.1 ml de *Adjuvante de Freud* na base da pata traseira direita. Cada grupo recebeu, respectivamente, formulações contendo nimesulida em nanocápsulas e na sua forma livre. No grupo controle, foi administrado gel contendo nanocápsulas vazias. A administração das formulações foi feita através de aplicação tópica de 50 mg de cada formulação, friccionando-se por 30 segundos. Para a determinação do índice de artrite aguda, os animais receberam a aplicação tópica das formulações, 1 hora antes da administração do *Adjuvante de Freud*. O edema foi medido após 18 horas e o valor obtido considerado como índice de artrite aguda. O tratamento foi repetido 2 vezes por dia até o 14º dia, quando foi realizada outra medição do volume de pata, e o valor foi tomado como índice de artrite crônica.

### 3.2.2.3. Modelo de indução da formação de tecido granulomatoso

O experimento foi realizado segundo protocolo descrito por Bastos e colaboradores (2007) com algumas adaptações. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, em três grupos de seis animais. O primeiro grupo foi considerado o grupo controle, sendo os demais tratados. Em condições assépticas, cada animal foi anestesiado por injeção local de lidocaína 0,2%. Após 15 minutos, os animais foram sedados com éter etílico e foi feita uma incisão longitudinal no dorso de cada animal, onde um *pellet* de algodão pesando 10 mg, previamente esterilizado, foi introduzido via subcutânea. Após a implantação, a incisão foi cuidadosamente fechada através de sutura cirúrgica. O tratamento foi iniciado no dia seguinte. Os grupos tratados receberam, respectivamente, gel contendo nimesulida nanoencapsulada e na forma livre, administrados topicamente, através de fricção de 50 mg de cada formulação no local da incisão, por 30 segundos. Os ratos foram tratados diariamente, durante seis dias. No sétimo dia, os animais foram sacrificados. O *pellet* de algodão foi removido e seco em estufa a 40 °C por 24 horas, tendo seu peso determinado.

### 3.2.2.4 Modelo de cicatrização

O modelo de cicatrização foi conduzido conforme método descrito por Pattanayak e Sunita (2008), com algumas modificações. O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com o grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilize B. Escobar.

Os animais foram divididos em três grupos de sete. Um dos grupos, considerado o controle, recebeu hidrogel contendo nanocápsulas vazias. Os outros dois grupos foram tratados, um com hidrogel contendo nimesulida na forma livre e o outro com hidrogel contendo o fármaco em nanocápsulas.

Os animais foram anestesiados com ketamina/xylazina 0,2 ml, através de administração intraperitoneal. Após a tricotomia, foi feita uma incisão cirúrgica em uma área de 1,5 x 1,5 cm no dorso de onde a pele foi removida. Logo após esse procedimento, os animais receberam o primeiro tratamento - 500 mg de cada formulação aos respectivos grupos - através de fricção por 30 segundos na área da lesão. Os animais foram mantidos em caixas separadas, com água e comida à vontade. Esse tratamento foi realizado duas vezes por dia durante sete dias. No oitavo dia os animais foram sacrificados, e o tecido em regeneração da área tratada foi removido.

A contração do tecido a qual contribui para a cicatrização da ferida foi analisada através de um traçado em torno da lesão, com auxílio de uma lâmina de polietileno transparente. Esse traçado foi, posteriormente transposto para uma folha de papel milimetrado. A área da ferida foi analisada quanto à retração do tecido no primeiro, no terceiro, no quinto e no sétimo dia utilizando o programa *Image J*<sup>®</sup>. O tecido em regeneração removido após os animais serem sacrificados, foi usado para determinação da atividade antioxidante *ex vivo*, através da técnica da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*).

### 3.2.3 Estudos *ex vivo*

#### 3.2.3.1 Atividade antioxidante – *TBARS*

Para a determinação da atividade antioxidante, foi usado o método de *TBARS* no tecido em regeneração removido do dorso dos animais após o experimento de cicatrização. O método foi seguido conforme descrito por Degim e colaboradores (2002), com algumas adaptações.

O tecido foi homogeneizado em Tris HCl (Hidroximetil aminometano + ácido clorídrico) 10 mM pH = 7.4, em uma diluição de 1:10 e centrifugado a 2.000 rpm durante 20 minutos. Após, foram retirados 100 µl do sobrenadante e adicionados 200 µl de tampão Tris HCl e incubado por 1 hora a 37°C. Passado o período de incubação, foram adicionados 200 µl de SDS 8,1% (Lauril sulfato de sódio), 500 µl de tampão ácido acético e 500 µl de TBA 0,67% (Ácido tiobarbitúrico). A mistura foi agitada e deixada em banho-maria por 1 hora a 90°C. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm.

### 3.2.4 Estudos *in vitro*

A atividade antioxidante das formulações semissólidas contendo o fármaco na forma livre e na forma nanoestruturada foi determinada, *in vitro*, através da técnica de captação do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH).

### 3.2.4.1 Atividade antioxidante - DPPH

Para determinação da atividade antioxidante *in vitro*, foi usado o método de captação do radical DPPH descrito por Choi e colaboradores (2002), com algumas adaptações.

Foram utilizadas amostras do hidrogel contendo nanocápsulas de nimesulida e do hidrogel contendo o fármaco na forma livre em solução de etanol, nas concentrações finais de 250, 125, 60, 30, 15, 3 e 1µg/mL. As amostras em triplicata foram filtradas em membrana de acetato de celulose e após colocadas em um balão volumétrico. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 2,5 ml de cada amostra em solução e colocada em tubo de ensaio onde foi adicionado 1,0 ml de solução de DPPH 0,3 mM em EtOH a cada tubo. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante trinta minutos. Após esse período foram realizadas as leituras das absorvâncias em 518 nm. A solução de DPPH (1,0 ml a 0,3 mM) foi usada como controle. Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante através da fórmula  $\% AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle}$ ,

onde  $Abs_{controle}$  é a leitura da absorvância do controle (solução de DPPH 0,3 mM);  $Abs_{branco}$  é a leitura da absorvância do branco (2,5 ml amostra e 1,0 ml de etanol) e  $Abs_{amostra}$  é a leitura da absorvância de cada amostra (2,5 ml amostra e 1,0 ml de DPPH 0,3 mM).

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por métodos de análise descritiva de variáveis, como média, desvio padrão, coeficiente de variação, estudos de correlação, regressão linear simples, análise de variância (ANOVA), teste “t” de Student, considerando-se níveis de significância  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 FORMULAÇÕES

As formulações contendo nanocápsulas de nimesulida usadas nesse estudo foram elaboradas pelo método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (Fessi, et al. 1998), previamente desenvolvidas e caracterizadas por Alves e colaboradores (2005), como descrito no item 3.2.1. As características físico-químicas da suspensão de nanocápsulas contendo nimesulida foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia do Centro Universitário Franciscano - UNIFRA e encontram-se descritas na Tabela 2.

TABELA 2 – Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas contendo nimesulida (NC/NM) (n=3).

	Diâmetro de Partícula (nm)	Índice de Polidispersão (%)	Potencial Zeta (mV)
NC/NM	*344,6 ± 4,33	*0,251 ± 0,002	*-10,3 ± 0,20

\* Médias das análises em triplicata ± desvio padrão;

Os dados obtidos através da análise das características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas contendo nimesulida foram similares aos obtidos por Alves e colaboradores (2005) no desenvolvimento e caracterização desses sistemas, os quais apresentaram características adequadas e satisfatórias para a realização dos experimentos.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados quatro modelos experimentais *in vivo*. Cabe ressaltar que existem poucos estudos *in vivo* realizados com os sistemas nanoestruturados. A maioria dos experimentos com esses modelos referem-se a estudos de avaliação do fármaco na forma livre.

#### 4.2.1 Edema de pata induzido pela carragenina

Através desse modelo, foi possível avaliar a atividade da nimesulida incorporada em diferentes formulações frente a um processo de inflamação aguda, ou seja, a resposta inicial do organismo frente à lesão tecidual. É nessa fase do processo inflamatório que há liberação de mediadores químicos, tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, em resposta à cascata do ácido aracdônico. Acredita-se que a nimesulida tem a função de inibir o desenvolvimento dessa cascata através da inativação da COX-2, uma vez que esta catalisa os primeiros passos na biossíntese das prostaglandinas (KUMMER e COELHO, 2002).

O período para a medição do volume do edema foi baseado no pico máximo de ação de o agente flogístico ocorrer em 3 horas após a injeção (VAJJA et al, 2004). No presente trabalho o volume da pata dos animais foi determinado uma única vez, como descrito no método seguido (GUPTA et al, 1996). Nesse modelo observou-se uma diminuição significativa do edema, cerca de 83%, como demonstrado na tabela 3 e figura 5, em ambos os grupos tratados (GHNCN e GHN) comparados ao grupo controle (GHNCV), ou seja, a nimesulida apresentou atividade anti-inflamatória independentemente da formulação à qual foi incorporada.

TABELA 3 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Formulações	Volume médio da pata (ml) $\pm$ desvio padrão	Inibição do edema (%) $\pm$ desvio padrão	DPR
GHNCV	1,94 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	-	8,02
GHNCN	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	83,12 $\pm$ 0,04	7,49
GHN	0,32 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	82,98 $\pm$ 0,03	7,98

Volume inicial (ml) 0,21  $\pm$  0,01; GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias (controle)

a-b: As médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ), de acordo com Teste de Tukey. (n=6). DPR – Desvio Padrão Relativo



Esses dados demonstram que o fármaco, mesmo nanoencapsulado e incorporado em gel hidrofílico, apresentou atividade anti-inflamatória significativa em relação ao grupo controle (GHNCV).

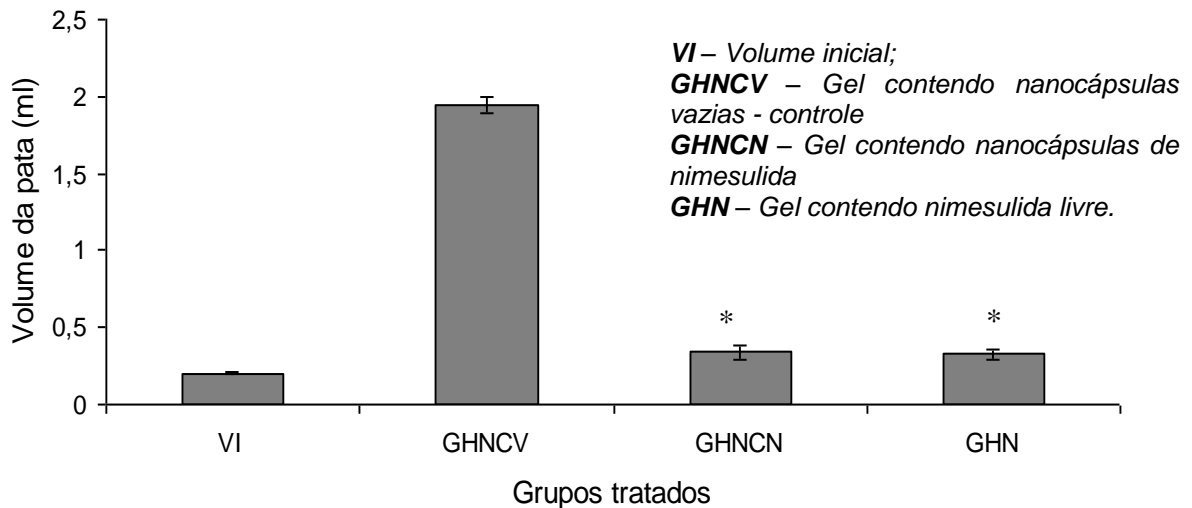


Figura 6 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre o edema de pata após 3 horas da injeção de carragenina.

\* *Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle ( $n=6$ ).*

Em um trabalho realizado por Shahiwala e colaboradores (2002), utilizando o mesmo modelo experimental de inibição do edema de pata induzido pela carragenina, os autores demonstraram a atividade anti-inflamatória tópica de niossomas contendo nimesulida em comparação com o fármaco na forma livre durante 24 horas. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a formulação que continha a nimesulida em niossomas demonstrou maior percentagem de inibição do edema após 24 horas (66,68%), em comparação com o fármaco na forma livre (12,57%). Os autores concluem que esses dados demonstram a liberação prolongada do fármaco promovida pelo nanocarreador. No presente estudo, em virtude do protocolo seguido, esse comportamento não foi observado.

A figura 7 demonstra a formação do edema induzido após 3 horas da injeção de carragenina nos diferentes grupos e a determinação do volume da pata por pletismografia, realizada em pletismômetro da marca UGO BASILE, modelo 7140 – Itália.

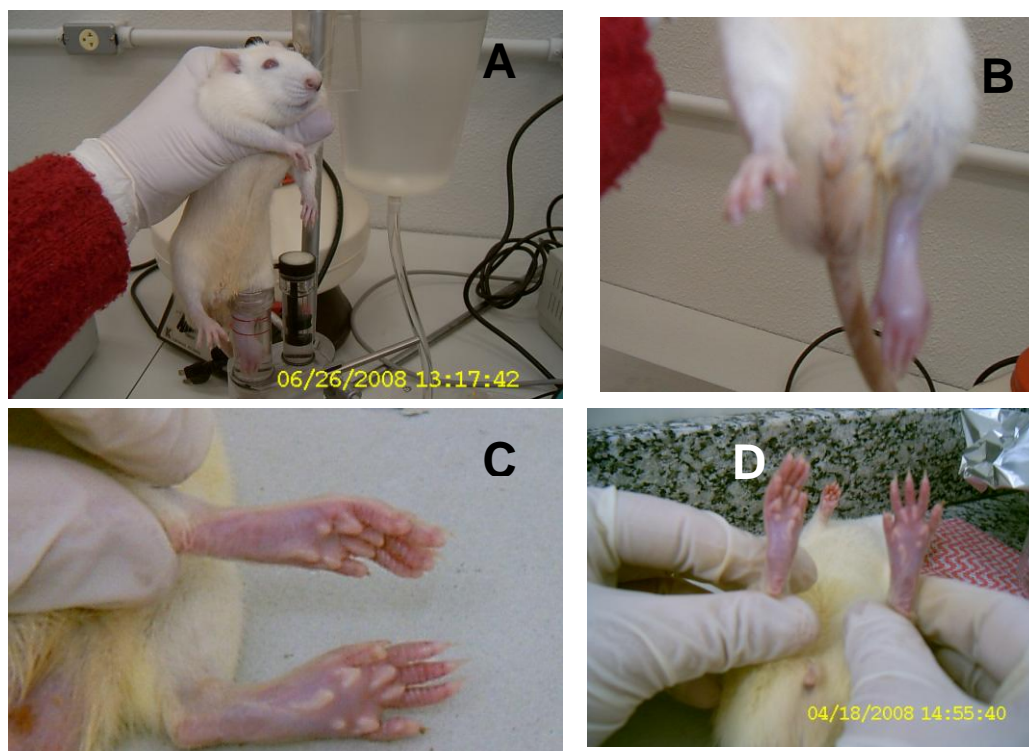


Figura 7 – A) Determinação do volume da pata através de pletismografia; B) Edema de pata em rato tratado com gel contendo nanocápsulas vazias (GHNCV); C) Edema de pata em rato tratado como a formulação contendo nimesulida na forma livre (GHN); D) Edema de pata em rato tratado com a formulação contendo nimesulida nanoestruturada (GHNCN).

Um estudo similar foi realizado por Beck (2000) com nanoesferas contendo dexametasona na dose de 0,03 mg/ kg, em comparação com o produto comercial contendo o fármaco livre (Decadron<sup>®</sup>). A via intraperitoneal foi empregada para administração das nanoesferas no ensaio de edema de pata induzido pela carragenina. O edema foi medido em vários intervalos de tempo após a administração do agente flogístico. A partir dos resultados obtidos, não foi possível observar diferença significativa entre a atividade do fármaco na forma livre e na forma nanoestruturada.

Embora os experimentos tenham sido realizados com fármacos diferentes, os resultados obtidos por Beck (2000) também foram observados no modelo de edema de pata realizado no presente trabalho.

Shakeel e colaboradores (2007) fazendo uso do mesmo modelo, porém com indução sustentada do edema por 24 horas, avaliaram a atividade anti-inflamatória de uma nanoemulsão para liberação tópica de aceclofenaco. A partir dos dados obtidos os autores demonstraram um excelente perfil anti-inflamatório da formulação testada, a qual foi capaz de inibir em 82,2% o edema de pata, e manter uma atividade sustentada por 24h, ao contrário do que aconteceu com o grupo controle do experimento, o qual foi tratado com gel com o fármaco livre, onde este, manteve boa atividade anti-inflamatória somente nas primeiras horas do experimento. Neste trabalho, o modelo de indução de edema de pata foi conduzido somente por 3 horas (GUPTA *et al*, 1996), não sendo possível observar o efeito sustentado das nanopartículas.

Em virtude de não ter sido observada diferença significativa na atividade do fármaco nas formas livre e nanoescapsulada na indução de processo inflamatório agudo, outros modelos experimentais foram testados.

#### 4.2.2 Indução de artrite por *Adjuvante de Freud*

O *Adjuvante de Freud* apresenta na sua composição uma micobactéria a qual age de forma a lesar a cartilagem articular hialina. A forma aguda compreende basicamente a liberação de mediadores químicos e os efeitos dos fenômenos vasculares e exsudativos tais como: vasodilatação arteriolar; aumento de permeabilidade vascular, ocasionando o edema inflamatório (Fig. 8) e a migração de leucócitos Cabe ressaltar que em qualquer fase da inflamação há liberação de mediadores químicos diferentes (HEGEN *et al*, 2008).

A forma crônica da artrite induzida por *Adjuvante de Freud* é um tipo de processo inflamatório em que, a partir da mediação química, aparecem os fenômenos degenerativos, ou seja, a matriz de colágeno associada à proteoglicanos e glicoproteínas que constituem a cartilagem hialina começam a ser degradadas.

Esse modelo experimental *in vivo* foi utilizado a fim de avaliar a atividade da nimesulida tanto na forma aguda, quanto na forma crônica da artrite, através da evolução do quadro de cada animal (HEGEN *et al*, 2008).

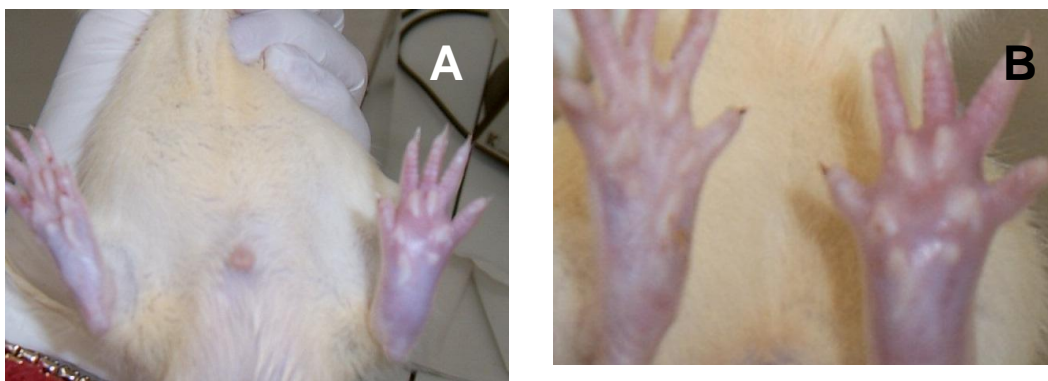


Figura 8 - A) Artrite aguda em rato tratado com gel contendo nimesulida na forma nanoestruturada (GHNCN); B) Artrite aguda em rato tratado com gel contendo nimesulida na forma livre (GHN).

Existem vários estudos comprovando a atividade anti-inflamatória da nimesulida na forma livre em modelos animais, porém há poucos artigos na literatura referentes à utilização do fármaco na forma nanoestruturada.

Gupta e colaboradores (1996) demonstraram a atividade anti-inflamatória da nimesulida na forma livre utilizando modelo *in vivo* de artrite, tanto aguda quanto crônica. A partir desse modelo experimental, os autores comparam a atividade da nimesulida com a atividade do piroxicam e do diclofenaco, utilizando também a via tópica para a administração do fármaco. Em ambas as fases do modelo de artrite, aguda e crônica, foi possível demonstrar uma inibição significativamente maior do edema promovido pela nimesulida, em relação aos demais fármacos. Porém, entre as formas aguda e crônica da artrite, a nimesulida mostrou-se mais eficaz na forma crônica, onde a percentagem de inibição do edema foi 36,47 e 52,78%, respectivamente.

Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo confirmam os resultados demonstrados por Gupta e colaboradores (1996), tanto na forma crônica, quanto na forma aguda da artrite.

No presente estudo, quando foi realizada a determinação da atividade anti-inflamatória para artrite aguda, sendo o volume determinado 18 horas após a administração do *Adjuvante de Freud*, não houve diferença significativa no volume da pata entre os grupos os quais foram tratados com as formulações que continham o fármaco livre (GHN) e as que continham o fármaco nanoestruturado (GHNCN) em relação ao controle GHNCV). A diminuição do

edema observada foi de aproximadamente, 27% e 31%, respectivamente. (Tabela 4 e Figura 8).

TABELA 4 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) no modelo de indução de artrite aguda por *Adjuvante de Freud*.

Formulações	Volume médio da pata (ml) ± desvio padrão	Inibição do edema (%) ± desvio padrão	DPR
GHNCV	2,27 ± 0,09 <sup>a</sup>	-	8,45
GHNCN	1,54 ± 0,04 <sup>b</sup>	30,83 ± 0,03	9,12
GHN	1,67 ± 0,10 <sup>b</sup>	26,87 ± 0,95	8,63

Volume inicial (ml) 0,30 ± 0,01 ; GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias - controle

a-b: As médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com Teste de Tukey. (n=6). DPR - Desvio Padrão Relativo

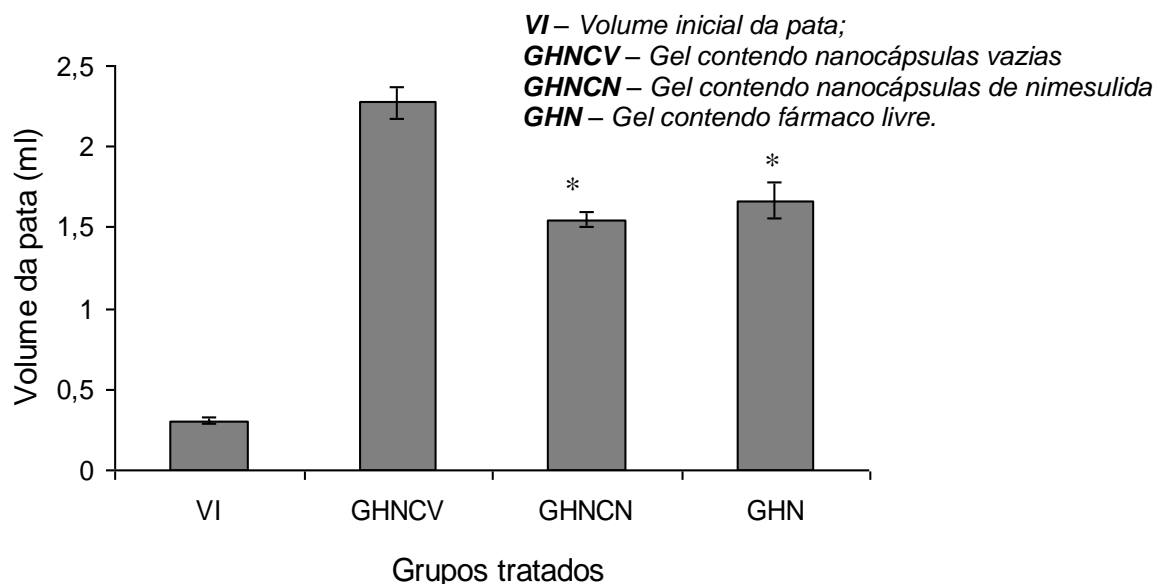


Figura 9 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre a artrite induzida após 18 horas da injeção do *Adjuvante de Freud*.

Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle

No modelo para determinação do índice de artrite crônica (medido no 14º), foi possível observar uma atividade anti-inflamatória significativamente maior da formulação com o fármaco nanoestrurado (GHNCN) do que aquela apresentada pelo fármaco na forma livre (GHN), tendo ocorrido uma diminuição de cerca de 81% do edema de pata (Tabela 5 e Fig. 10).

TABELA 5 – Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestrurada (GHNCN) no modelo de indução de artrite crônica por *Adjuvante de Freud*.

Formulações	Volume médio da pata (ml) ± desvio padrão	Inibição do edema (%) ± desvio padrão	DRP
GHNCV	2,23 ± 0,11 <sup>a</sup>	-	9,56
GHNCN	0,43 ± 0,05 <sup>b</sup>	81,5 ± 0,06	9,14
GHN	1,64 ± 0,17 <sup>c</sup>	27,75 ± 0,17	10,02

Volume inicial (ml) 0,30 ± 0,01 ; GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias - controle  
a-b-c: As médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com Teste de Tukey. (n=6). DPR - Desvio Padrão Relativo

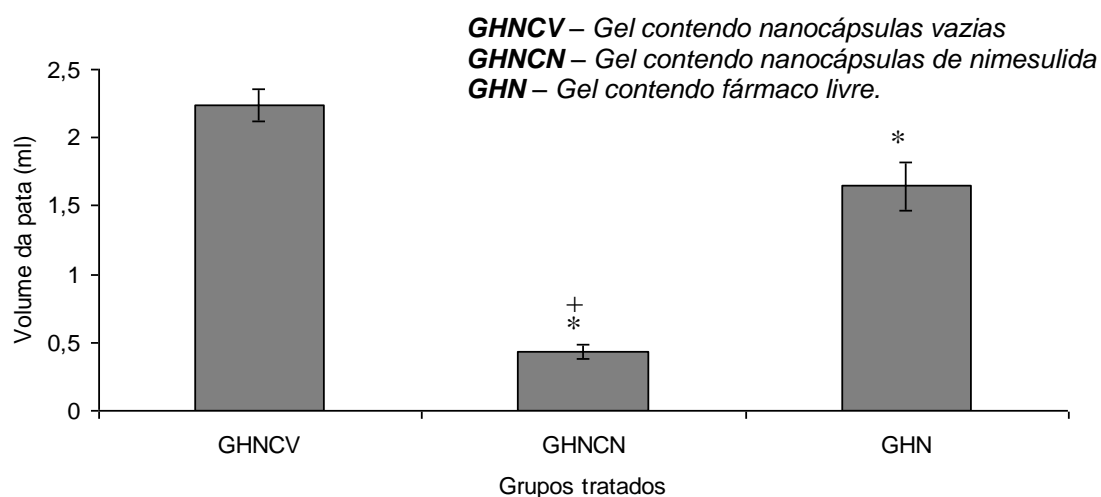


Figura 10 – Efeito dos géis contendo nimesulida sobre a artrite crônica após 14 dias da injeção do *Adjuvante de Freud*.

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; + Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao GHN.

A ausência de diferença significativa no modelo de artrite aguda entre o fármaco livre e o nanoestruturado e a grande percentagem de inibição do edema no modelo de artrite crônica pela nimesulida em nanocápsulas podem ser atribuídos ao efeito reservatório das nanopartículas. Esse efeito reservatório pode ser o responsável por prolongar e/ou intensificar a atividade anti-inflamatória da nimesulida em nanocápsulas, como foi demonstrado por Shahiwala e colaboradores (2002), em um estudo já citado anteriormente, no qual foram realizados experimentos avaliando a atividade de géis contendo niossomas de nimesulida. Os resultados demonstraram a atividade anti-inflamatória desses sistemas em 24 horas, na qual o efeito reservatório pôde ser observado claramente. Os autores observaram que, a partir da 3ª hora, o efeito de inibição do edema começou a ser intensificado, ao contrário da formulação contendo o fármaco livre, quando somente foi possível observar atividade anti-inflamatória nas primeiras quatro horas do experimento.

Esse mesmo comportamento também foi demonstrado por Puglia e colaboradores (2008), quando os autores observaram um possível efeito reservatório das nanopartículas. Nesse estudo, um modelo *in vivo* de eritema induzido por UVB foi utilizado para testar formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo cetoprofeno ou naproxeno, bem como formulações contendo os mesmos fármacos na forma livre. Os autores observaram que, na primeira hora do experimento, as formulações que continham o fármaco livre foram mais efetivas, diminuindo o eritema. Por outro lado, em três horas de experimento, a situação foi reversa, ou seja, nos grupos tratados com as formulações que continham o fármaco nanoestruturado, o efeito terapêutico foi maior, sendo demonstrado pela diminuição do eritema e mantido por cerca de cinco a seis horas, dependendo do fármaco utilizado.

Recentemente, estudos realizados por Brum (2008), utilizando modelo *in vivo* de dermatite induzida por níquel, também sugerem um comportamento reservatório para os nanocarreadores. Nesse estudo, foi avaliada a atividade da dexametasona na forma nanoencapsulada e na forma livre, incorporadas em creme gel. Após a sensibilização, os animais foram tratados diariamente com aplicação tópica das formulações na área previamente sensibilizada. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados, e a área tratada foi removida. Através de análises histológicas, a autora observou um grau maior de atrofia na pele dos animais tratados com a formulação que continha o fármaco nanoestruturado. Esse alto grau de atrofia pode ser atribuído a um maior tempo de ação do fármaco na pele, o que sugere um possível efeito reservatório das nanocápsulas. Esse

comportamento do fármaco nanoestruturado pode determinar uma liberação controlada do mesmo, quando utilizado por essa via, potencializando sua atividade.

O uso do modelo animal de indução de artrite representa um papel importante na avaliação de fármacos para o tratamento da artrite reumatóide. Em virtude de a nimesulida ser um dos AINEs mais prescritos para esse tipo de quadro clínico, a avaliação, *in vivo*, da atividade do fármaco usando nanotecnologia faz-se de extrema importância, em virtude, principalmente, das alterações comportamentais dos fármacos quando nanoestruturados.

#### 4.2.3 Indução da formação de tecido granulomatoso

A formação do granuloma no local do implante do *pellet* de algodão está relacionada com acúmulo de fluido, material protéico e com infiltração de neutrófilos. Ao final do experimento de sete dias, o granuloma pode ser caracterizado pela formação de uma cápsula fibrosa, vascularizada, contendo fibroblastos e apresentando, ainda, infiltração de células polimorfonucleares. Assim, quanto menor for a formação dessa cápsula, maior será a atividade anti-inflamatória do fármaco (Le Bars *et al*, 2001) (Fig. 11).



Figura 11 – Granulomas removidos dos animais do grupo tratado com gel contendo nanocápsulas de nimesulida (GHNCN), no sétimo dia do experimento e secos em estufa a 40°C.



A Figura 12 apresenta fotografias do procedimento de introdução do *pellet* de algodão por incisão cirúrgica.



Figura 12 – A) Abertura da incisão dorsal para implante do *pellet* de algodão; B) Incisão aberta.; C) *Pellet* introduzido e incisão fechada por sutura cirúrgica.

Esse modelo foi utilizado para avaliação da nimesulida nas diferentes formulações, frente a um processo de inflamação crônica. O experimento demonstrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade anti-inflamatória entre as duas formulações contendo tanto o fármaco na forma livre quanto na forma nanoestruturada (GHN e GHNCN), em relação ao grupo controle (GHNCV). No grupo tratado com o fármaco nanoestruturado, foi possível observar uma redução de 36,6% no peso do granuloma formado (47,mg), em relação ao grupo controle (76,5mg). Entretanto, no grupo tratado com fármaco livre, essa redução foi cerca de 3% apenas (74,3mg) (Tabela 6 e Figura 13). Os resultados demonstram uma inibição significativamente maior da formação do granuloma pela nimesulida nanoencapsulada comparada tanto ao grupo controle como ao grupo tratado com o fármaco na forma livre.

Esse modelo é bastante utilizado em pesquisas nas quais se deseje avaliar a atividade anti-inflamatória de um fármaco de forma crônica. O processo inflamatório crônico pode ser designado como uma inflamação de duração prolongada em que a inflamação ativa, a destruição tecidual e a tentativa de reparo ocorrem simultaneamente. Em virtude disso, há uma neovasogênese seguida pela formação da cápsula fibrosa, caracterizada nesse modelo como granuloma.

TABELA 6 - Atividade anti-inflamatória das formulações contendo nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) no modelo de indução de granuloma por *pellet* de algodão

Formulações	Peso médio do granuloma (mg) ± desvio padrão	Inibição da formação do granuloma (%) ± desvio padrão	DRP
GHNCV	76,51 ± 4,25		12,56
GHNCN	47,08 ± 4,36	36,66 ± 4,42	13,21
GHN	74,34 ± 1,25	2,82 ± 1,23	9,12

GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias - controle

a-b: As médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com Teste de Tukey. ( $n=6$ ). DPR - Desvio Padrão Relativo

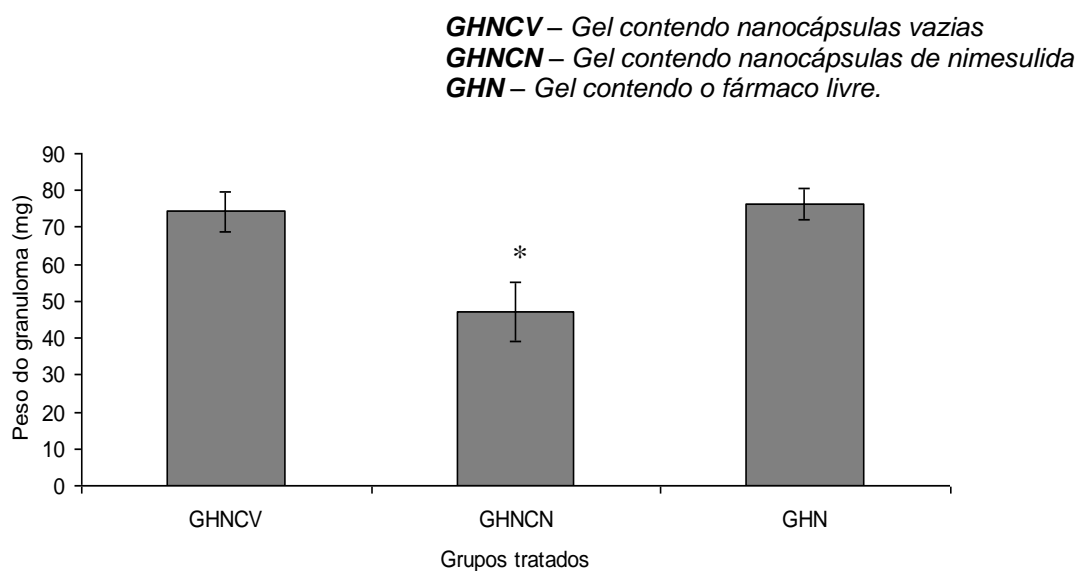


Figura 13 – Efeito dos géis de nimesulida sobre a formação do granuloma, após 7 dias da introdução do *pellet* de algodão.

Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (GHNCV) e ao fármaco livre (GHN).

Milão (2001) realizou estudos com suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco incorporadas em hidrogéis com objetivo de comparar a atividade anti-inflamatória do fármaco entre a forma livre e a nanoestruturada. Para determinação da atividade do diclofenaco em processo inflamatório crônico, a autora utilizou também o método de indução de formação de tecido granulomatoso, quando foi possível observar uma inibição significativa da formação do granuloma para o grupo tratado com a formulação contendo diclofenaco nanoestruturado, em relação ao grupo controle. Porém, nesse experimento, não foi possível evidenciar diferença significativa entre as formulações contendo suspensão de nanocápsulas de diclofenaco e a formulação contendo diclofenaco na forma livre, cujas aplicações tópicas conduziram a granulomas de pesos médios estatisticamente semelhantes.

Um estudo semelhante realizado por Beck (2003) determinou a atividade anti-inflamatória de uma formulação de nanoesferas contendo dexametasona em comparação com o produto comercial, Decadron<sup>®</sup>. O método de indução da formação de tecido granulomatoso também foi utilizado neste estudo. Os resultados não apresentaram diferença significativa entre os valores referentes a atividade anti-inflamatória para as formulações que continham o fármaco na forma livre e na forma nanoestruturada, tendo os granulomas apresentado pesos entre de 78,58 mg e 72,15 mg, respectivamente, embora tenha sido observada uma inibição mais acentuada da formulação que continha o fármaco na forma nanoestruturada.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem uma liberação prolongada do fármaco na forma nanoestruturada, o qual exerceu uma atividade anti-inflamatória mais persistente do que o fármaco na forma livre. A ação sustentada do fármaco pode ser atribuída à presença do nanocarreador, elemento que promove uma degradação mais lenta do mesmo.

#### 4.2.4 Cicatrização

A cicatrização de feridas compreende uma cadeia de processos necessários para o reestabelecimento do tecido lesado. Esses processos variam de acordo com a severidade e com a profundidade da lesão, sendo inter-relacionados e baseados, resumidamente, em três fases: inflamação, granulação e remodelamento do tecido, resultando em retração do mesmo até o completo fechamento da lesão e substituição da epiderme (PATTANAYAK E SUNITA, 2008).

O estágio de inflamação começa imediatamente após a lesão, com vasoconstrição que favorece a homeostase, e com liberação de mediadores inflamatórios. A fase proliferativa é caracterizada pela formação da granulação do tecido, produção de fibroblastos e processo de

angiogênese. O estágio de remodelamento é caracterizado pela participação de fibras de colágeno, as quais promovem a retração do tecido (Fig. 14) (PATTANAYAK E SUNITA, 2008).



Figura 14 – Retração do tecido em torno da lesão no modelo de cicatrização no 3º dia em rato do grupo tratado com nimesulida nanoestruturada (GHNCN).

O uso de fármacos inibidores da ciclo-oxigenase – 2 (COX-2), neste caso a nimesulida, pode promover um aumento na velocidade de cicatrização, mostrado pela retração do tecido em torno da lesão, como consequência da atividade inibitória da COX-2 e da capacidade de reduzir a geração de radicais livres, responsáveis pelo aumento do dano tecidual durante o processo inflamatório.

No presente trabalho, o modelo de cicatrização foi utilizado para a avaliação de dois parâmetros: atividades cicatrizante e antioxidante das diferentes formulações contendo nimesulida. Ao término do experimento, foi possível observar maior retração do tecido em torno da lesão naqueles animais tratados com as formulações que continham o fármaco (GHN e GHNCN), em relação ao grupo controle (GHNCV) (Tab. 7 e Fig. 15).

TABELA 7 – Atividade da nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), incorporada em formulações semissólidas sobre a retração do tecido em torno da lesão.

Medições (dias)	Formulações	Área da lesão (mm <sup>2</sup> )							Média	DP	DRR
		Animais									
		1	2	3	4	5	6	7			
1°	GHNCN	287	319	241	356	308	304	356	310	23,4	7,54
3°	GHNCN	281	269	254	257	257	282	251	264	12,9	4,89
5°	GHNCN	371	356	298	277	271	292	243	301	46,3	15,4
7°	GHNCN	336	228	250	202	195	277	263	250	48,5	19,4
1°	GHN	339	317	374	355	367	339	384	354	23,5	6,48
3°	GHN	236	262	367	297	302	308	239	287	46	16
5°	GHN	215	238	295	218	248	258	280	250	30	12
7°	GHN	191	219	251	194	200	231	231	216	22,5	10,4
1°	GHNCV	323	284	360	354	285	321	271	314	35,2	11,2
3°	GHNCV	284	302	278	308	282	302	293	292	11,4	3,91
5°	GHNCV	368	295	281	291	243	262	275	287	39,5	13,8
7°	GHNCV	348	279	305	246	242	250	297	281	38,8	13,8

GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias – controle

DP – Desvio Padrão; DPR – Desvio Padrão Relativo

Levando-se em consideração o 1° e o 7° dia do experimento, observa-se que a nimesulida na forma livre foi capaz de promover uma redução significativamente maior da lesão, tanto em relação ao grupo controle (GHNCV) quanto em relação ao grupo tratado com a forma nanoestruturada do fármaco (GHNCN), sendo a percentagem de retração do tecido em torno da lesão de 10,5, 19,35 e 38,82 para GHNCV, GHNCN e GHN, respectivamente (Fig. 16).

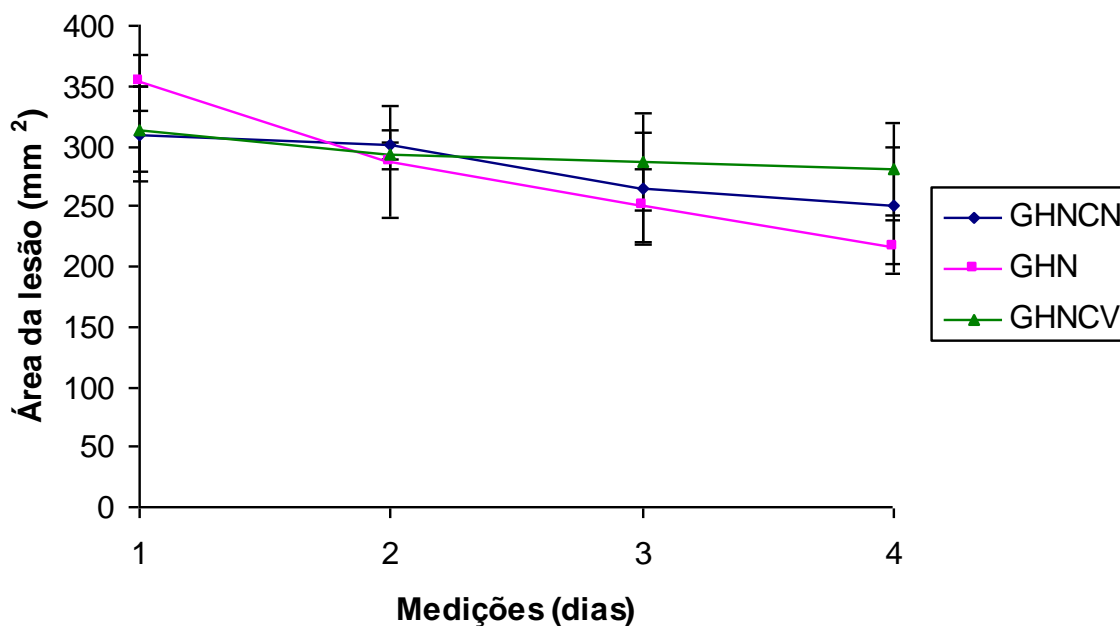


Figura 15 – Médias das áreas das lesões no 1º, 3º, 5º e 7º dia nos grupos tratados com as diferentes formulações contendo nimesulida (GHN e GHNCN) e no grupo controle (GHNCV).

As determinações da área da lesão foram realizadas em dias alternados durante o experimento, isto é, o tamanho da área ulcerada em mm<sup>2</sup> foi determinada no 1º, 3º, 5º e 7º dia de experimento. Durante as 2 primeiras medições, não foi possível observar diferença na área. Na 3ª medição observou-se uma retração maior do tecido naqueles animais tratados com as formulações as quais continham o fármaco, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Somente no 7º dia, ou seja, na última medição foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com o fármaco livre (GHN) e o grupo controle (GHNCV).

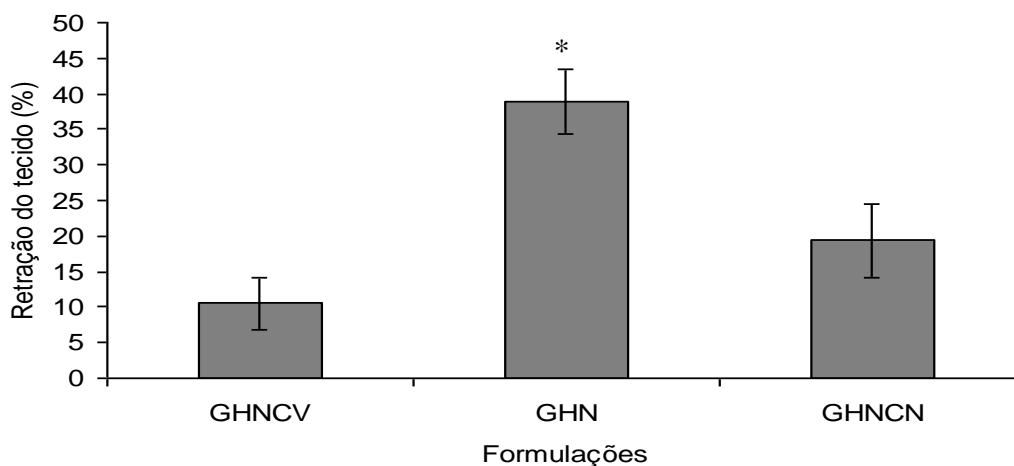


Figura 16 - Retração da lesão induzida no modelo de cicatrização produzida pela nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN) e incorporada em formulações semissólidas.

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao GHNCV; GHNCV – Gel contendo nanocápsulas vazias - controle

As determinações da área da lesão foram realizadas em dias alternados durante o experimento, isto é, o tamanho da área ulcerada em  $\text{mm}^2$  foi determinada no 1º, 3º, 5º e 7º dia de experimento. Durante as 2 primeiras medições, não foi possível observar diferença na área. Na 3ª medição observou-se uma retração maior do tecido naqueles animais tratados com as formulações as quais continham o fármaco, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Somente no 7º dia, ou seja, na última medição foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com o fármaco livre (GHN) e o grupo controle (GHNCV).

Estudos anteriores realizados com a nimesulida nanoestruturada e administrada topicamente sobre a pele íntegra referem uma preferência da mesma pela epiderme com relação ao fármaco livre (ALVES et al, 2007). Entretanto, quando administrada sobre a lesão, de onde foi removida a barreira epidérmica, as nanocápsulas contendo o fármaco podem não ser capazes de permanecer no local aplicado, promovendo maior absorção do fármaco em virtude da ausência da barreira conferida pela pele, a qual, quando intacta, é capaz de agir como reservatório do fármaco.

O modelo de cicatrização é comumente usado em ensaios para avaliação da atividade de determinada substância e/ou fármaco sobre a retração do tecido em torno da lesão. Um fármaco pode não necessariamente apresentar atividade direta sobre a cicatrização, mas

promovê-la indiretamente, como por exemplo, através de atividade antioxidante, na qual a redução da geração de radicais livres diminui o dano tecidual, favorecendo a cicatrização (JORGE *et al.*; 2008).

O modelo de cicatrização também foi utilizado por Jorge e colaboradores (2008) para determinar a atividade tópica do extrato de *Arrabidaea chica* sobre a lesão dorsal induzida. Os animais foram divididos em grupos em que um deles foi o controle positivo, tratado com alantoína, o outro foi o controle negativo, tratado com solução salina 0,9% e o terceiro grupo foi tratado com a amostra a ser analisada. Os resultados obtidos demonstraram que a área ulcerada diminuiu 13% após o segundo dia de aplicação do extrato e, ao final do experimento de 10 dias, esse valor aumentou para 96%, em comparação com o controle negativo, no qual a retração foi cerca de 36%.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante da nimesulida na forma livre tem sido comprovada por várias pesquisas, entre elas, os estudos realizados por Khanudja e colaboradores (2006) e Nakamura e colaboradores (2003). Tais estudos demonstraram a ação antioxidante da nimesulida na sua forma livre através de diferentes modelos experimentais. Entretanto, existem poucos relatos na literatura sobre a nimesulida na forma nanoestruturada com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante.

Nesse intuito, a capacidade da nimesulida de reduzir e/ou inibir o dano oxidativo causado pela geração excessiva de radicais livres foi avaliada, no presente estudo, por meio de dois experimentos: um deles *in vitro*, o qual mede a capacidade do fármaco de sequestrar o radical 2-2 difenil-picril-hidrazila (DPPH) e o outro foi realizado *ex vivo*, com uma técnica que quantifica produtos resultantes da peroxidação lipídica. Ambas as técnicas estão descritas, separadamente, nos itens 3.2.3.1 e 3.2.4.1 e serão discutidas concomitantemente.

Tanto a técnica do DPPH quanto a dosagem de *TBARS* foram realizadas não apenas para a formulação contendo nanocápsulas de nimesulida (GHNCN) como também para a formulação contendo o fármaco na forma livre (GHN).

Como demonstra a tabela 8 e a figura 17, observou-se um aumento gradativo da atividade antioxidante do fármaco. Para ambas as formulações contendo nimesulida (GHNCN e GHN), é possível observar que esse aumento foi significativamente mais intenso, até, aproximadamente, a concentração de 60 µg/ml. A partir dessa concentração a percentagem de atividade antioxidante não apresentou aumento significativo entre as demais concentrações.



TABELA 8 – Atividade antioxidante da nimesulida na forma nanoestruturada (GHNCN) e na forma livre (GHN), na técnica do DPPH (n=3).

Concentração de nimesulida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Atividade antioxidante (%) $\pm$ desvio padrão	
	GHNCN	GHN
250	87,21 $\pm$ 0,62	80,58 $\pm$ 0,26
125	83,82 $\pm$ 2,03	78,27 $\pm$ 3,02
60	80,43 $\pm$ 3,51	74,42 $\pm$ 2,81
30	74,42 $\pm$ 3,42	65,48 $\pm$ 3,05
15	65,17 $\pm$ 3,11	49,61 $\pm$ 3,14
3	8,16 $\pm$ 3,23	5,54 $\pm$ 2,99
1	2,61 $\pm$ 1,51	1,23 $\pm$ 3,21

Entre as duas formulações, não houve diferença significativa na atividade antioxidante, embora possa ser observada maior atividade com a nimesulida nanoestruturada. Cabe salientar que a nimesulida nanoencapsulada continuou mantendo sua atividade antioxidante após incorporada à formulação semissólida, demonstrando efeito similar ao fármaco na forma livre.

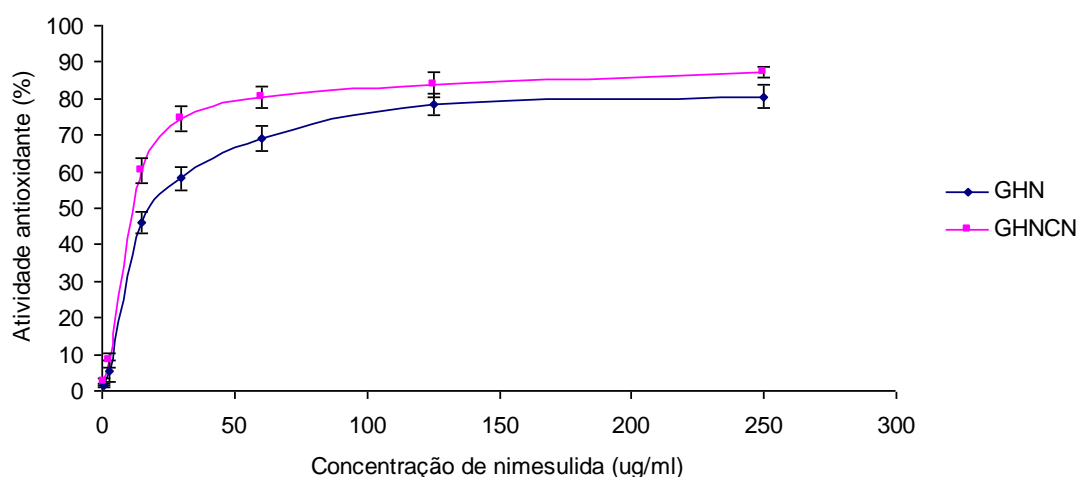


Figura 17 – Atividade antioxidante *in vitro* da nimesulida (DPPH) em diferentes concentrações para as formulações semissólidas contendo a nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN).

Para avaliação da atividade antioxidante *ex vivo* da nimesulida foi realizada a técnica de dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) quantificadas no tecido removido da área lesada dos animais tratados após o experimento de cicatrização.

Na Figura 18, é possível observar uma redução nos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido analisado, tanto para animais tratados com o hidrogel contendo nanocápsulas de nimesulida (GHNCN) quanto para aqueles tratados com o fármaco livre (GHN), nas quais os níveis de MDA foram, 526,5 e 730,20 nmol MDA/g tecido para o GHNCN e para o GHN, respectivamente, comparados com o grupo controle (GHNCV), em que o índice foi de 1.457 nmol MDA/g tecido. Entretanto, observa-se que a formulação com o fármaco nanoestruturado demonstrou uma atividade significativamente mais intensa do que aquela com o fármaco livre, embora em ambas as formulações a nimesulida tenha apresentado atividade antioxidante de forma significativamente maior em relação ao controle.

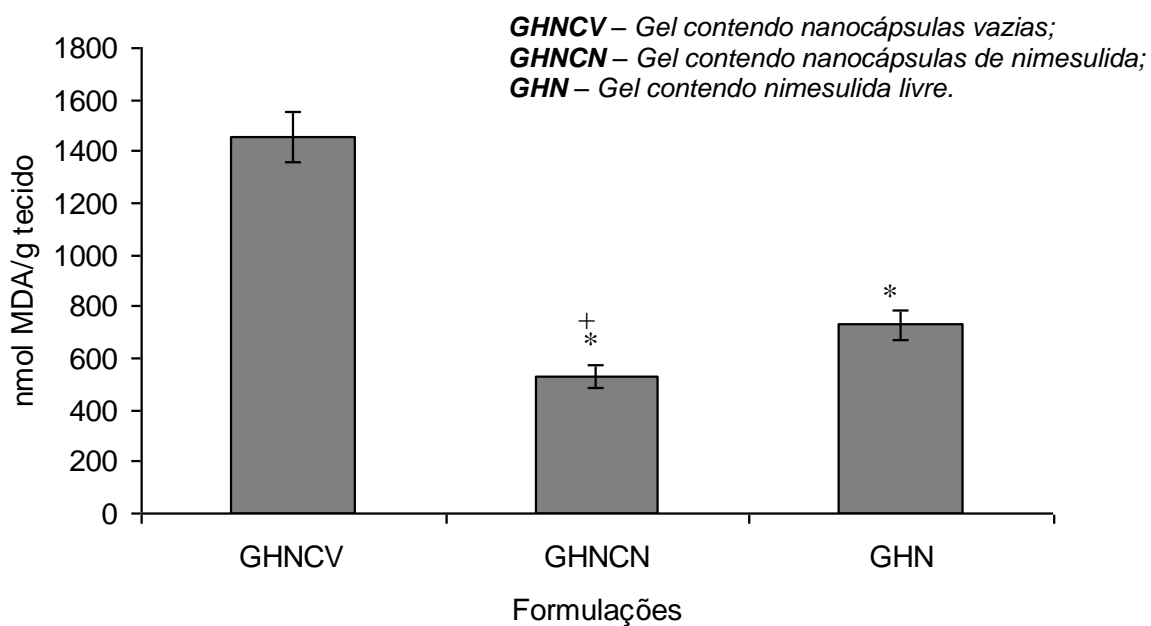


Figura 18 – Atividade antioxidante *ex vivo* da nimesulida na forma livre (GHN) e na forma nanoestruturada (GHNCN), em relação ao controle (GHNCV).

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; + Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao GHN.

Utilizando diferentes modelos experimentais, vários estudos têm comprovado a ação antioxidante da nimesulida. Nakamura e colaboradores (2003) demonstraram a capacidade da nimesulida em reduzir os níveis de peroxidação lipídica a partir de estudos comparativos entre a atividade antioxidante do celecoxibe, inibidor da ciclo-oxigenase – 2 (COX-2) e da Lipoxigenase – 5 (LO-5) com a da nimesulida, inibidor da COX-2. Para a realização desse experimento foi utilizado um modelo experimental com ratos em que o estresse oxidativo na pele foi induzido por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA). Dados quantitativos da geração total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) demonstram que o tratamento com nimesulida inibiu de forma significativa os níveis de *TBARS* (0,37 nmol/cm<sup>2</sup>) em relação ao celecoxibe (0,5 nmol/cm<sup>2</sup>), embora este seja um inibidor mais seletivo da COX-2. Outras análises demonstram, ainda, que a nimesulida foi capaz de promover uma significativa redução na geração de peróxido de hidrogênio, bem como da migração leucocitária, comparada com o celecoxibe. Os autores concluíram que os resultados obtidos evidenciam a ação antioxidante da nimesulida, e acrescentaram, ainda, a crescente exploração dos antioxidantes como agentes de tratamento quimiopreventivo em casos de carcinogênese relacionada com processo inflamatório como câncer de cólon e de pele.

Um outro estudo realizado por Khanduja e colaboradores (2006), demonstrou, *in vitro*, uma significativa atividade antioxidante da nimesulida, na qual um pré-tratamento com o fármaco foi capaz de suprimir, de forma significativa, a geração de ânion superóxido produzido por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), em fluido de lavagem broncoalveolar de ratos. Além disso, também utilizando a técnica de *TBARS*, foram detectados níveis significativamente menores de malondialdeído (MDA) no lavado broncoalveolar dos animais tratados previamente com a nimesulida.

Pesquisas recentes comprovam, ainda, uma ação antiepilética indireta da nimesulida. Em virtude da inibição seletiva da COX-2, há um bloqueio na cascata do ácido aracdônico, o que gera uma diminuição na síntese de prostaglandinas, resultando em níveis reduzidos de radicais livres. Dhir e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antiepilética da nimesulida através de modelo experimental com ratos no qual o sistema nervoso central é estimulado por pentilenetetrazol (PTZ), o que leva a um quadro de alterações bioquímicas e comportamentais. Para isso, os animais receberam PTZ (40mg/Kg i.p.) em dias alternados durante 15 dias. O tratamento com a nimesulida foi feito diariamente em doses de 2,5 e 5 mg/Kg para cada respectivo grupo. No 16º dia os animais foram sacrificados e o cérebro foi removido, no qual foram feitas várias dosagens. Os autores observaram que ambas as doses do fármaco, 2,5 e 5 mg/Kg, foram capazes de reduzir os níveis de malondialdeído (MDA) em

89.4 e 74.5 %, respectivamente, em relação ao grupo controle, o qual somente recebeu estimulação por PTZ e não foi tratado. Foi possível observar ainda, uma diminuição nos níveis de nitritos para ambas as doses (2,5 e 5 mg/Kg) os quais foram de 510.6 e de 326.6 µg/ml, respectivamente. Esses dados demonstram a eficácia da nimesulida na inibição da peroxidação lipídica. Além disso, o tratamento com o fármaco demonstrou uma atividade significativamente menor da mieloperoxidase - enzima indicativa de recrutamento de leucócitos polimorfonucleares no cérebro - no grupo tratado com nimesulida 5 mg/Kg.

Os dados obtidos nos estudos de Dhir e colaboradores (2007) corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual a atividade antioxidante da nimesulida torna-se evidente em modelos *in vivo*, pois um pré-tratamento com esse fármaco é capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica, fato demonstrado claramente pela dosagem de *TBARS*.

Recentemente, estudos têm sido desenvolvidos com relação a uma possível atividade neuroprotetora da nimesulida, devido à sua atividade antioxidante. Em modelos experimentais com ratos, o pré-tratamento com nimesulida resultou em diminuição da lesão cerebral causada por isquemia induzida (STRAUSS; 2008).

De acordo com os resultados obtidos nos dois experimentos para determinação da atividade antioxidante da nimesulida, foi possível observar que as formulações nas quais o fármaco foi incorporado não apresentaram influência na sua ação. Ou seja, a nimesulida nanoencapsulada e incorporada em hidrogel como veículo, manteve a atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *ex vivo*. Além disso, através da técnica de *TBARS*, a nimesulida nanoestruturada apresentou maior atividade do que na forma livre. Esse comportamento sugere uma vetorização do fármaco para o local da lesão, juntamente com uma liberação prolongada, demonstrada por Alves e colaboradores (2007) quando os autores observaram uma preferência do fármaco nanocarreado pela epiderme. Esse comportamento faz com que o fármaco fique agindo por mais tempo no local alvo, promovendo, dessa forma, maior inibição da formação de radicais livres e, conseqüentemente, uma diminuição no dano tecidual provocado pela presença desses radicais durante o processo inflamatório.

No presente estudo, a avaliação da atividade da nimesulida sobre a cicatrização reforça os resultados obtidos nos ensaios de captação do radical DPPH e *TBARS*, nos quais foi demonstrada a atividade antioxidante desse fármaco.

## 5 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos através da análise das características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas contendo nimesulida foram similares aos obtidos por Alves e colaboradores (2005) no desenvolvimento desses sistemas, os quais apresentaram características adequadas e satisfatórias para a realização dos experimentos;
- O uso de modelos experimentais *in vivo* demonstrou que a nimesulida apresenta atividade anti-inflamatória satisfatória quando nanoencapsulada;
- Tanto no ensaio de edema de pata de rato induzido pela carragenina quanto no modelo de indução de artrite aguda, a nimesulida demonstrou adequada atividade antiedematogênica tanto na forma livre (GHN) quanto na forma nanoestruturada (GHNCN);
- No modelo de artrite crônica a formulação contendo a nimesulida em nanocápsulas e incorporada ao gel (GHNCN) promoveu uma significativa redução do edema, em relação ao fármaco na forma livre incorporado no mesmo veículo (GHN);
- A partir do modelo de artrite crônica foi possível demonstrar um efeito reservatório promovido pela presença do nanocarreador;
- No modelo de indução da formação de tecido granulomatoso, o gel contendo a nimesulida em nanocápsulas (GHNCN) apresentou uma atividade significativamente maior do que aquela demonstrada pelo fármaco na forma livre em hidrogel (GHN), o qual não foi capaz de inibir e/ou reduzir de forma significativa a formação da cápsula fibrosa, demonstrando níveis de inibição comparáveis ao controle (GHNCV);
- O uso do nanocarreador foi capaz de intensificar de forma significativa a atividade anti-inflamatória da nimesulida frente a processos inflamatórios crônicos;

- Além da atividade antiedematogênica, a nimesulida apresentou adequada atividade antioxidante, como demonstrado no ensaio *in vitro* de captação do radical DPPH, no qual ambas as formulações (GHNCN e GHN) apresentaram atividade antioxidante satisfatória;
- Na determinação *ex vivo* da atividade antioxidante através da técnica de *TBARS*, a nimesulida nanoencapsulada e incorporada em gel (GHNCN) foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de malondialdeído (MDA) em relação a sua forma livre incorporada no mesmo veículo (GHN);
- Através da técnica de *TBARS* foi possível concluir que o nanocarreador promoveu intensificação da atividade antioxidante da nimesulida;
- A nimesulida, na forma nanoencapsulada e incorporada em hidrogel como veículo (GHNCN) manteve tanto a atividade anti-inflamatória quanto a antioxidante. Dessa forma, o uso do nanocarreador e a via tópica podem representar uma forma alternativa eficaz para administração da nimesulida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, J., CARRÉ, F., DINH-XUAN, A. T., *et al.* **Fisiologia**. Ed. Guanabara – Koogan. RJ, 2006.

ALVES, M. P. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimerto, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2006.

ALVES, M. P.; SCARROBONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**. V.341, p. 215-220, 2007.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**. V. 60, p. 900-904, 2005.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: Local versus transdermal activity. **Research Focus**. V. 3 N. 1, 2000.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, ed. 2ª, Porto Alegre:2005.

AZULAY, R.D; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 4ª ed. Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2006.

BACELLI, G.K.; ABDALA, J.M.A.; BRAZ, L.A. *et al.* Efeitos da indução de mediadores químicos em edema de pata: Avaliação de parâmetros do pletismógrafo. **VIII Encontro Latino-americano de Inic. Cient. E IV Encontro Latino-americano de Pós-graduação**. Univ. Vale do Paraíba, 2007.

BAILEY, P.J., STURM, A, LOPES-RAMOS, A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexametasone and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**. V. 31, p.1213-1218, 1982.

BANSAL, S.S.; JOSHI, A.; BANSAL, A.K. New dosage formulations for targeted delivery of cyclo-oxygenase – 2 inhibitors. **Drugs Aging**. V.24 (6), p. 441-451, 2007.

BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutic Sciences of Technology Today**, V. 5, p.163-171, 2000.

BHASKAR, K.; ANBU, J.; RAVICHANDIRAN, V. V.; RAO, Y. M. Lipid nanoparticles for transdermal, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies. **Lipids in Health Disease**. V. 8, p. 6, 2009.

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

BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; FREDO, R.J.; MICHALOWISKI, C.B.; BARCELLOS, I.; FUNK, J.A.B. Nanoparticles containing dexamethasone: Physicochemical properties and anti-inflammatory activity. **Acta Farma Bonaerense**. V. 22 (1): 11-5, 2003.

BECK, R.C.R. Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas contendo dexametasona. Avaliação da atividade anti-inflamatória do fármaco associado. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa maria - UFSM, Brasil. 2000.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences**. V. 47, p. 223-261, 1996.

BJARNASON, I.; THJODLEIFSSON, B. – Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. **Rheumatology**. V.38, p. 24-32. 1999.

BRAND, D. D. Rodent models of rheumatoid arthritis. **Reumatic Diseases** V. 55, p. 114-122, 2005.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. **European Academy of Dermatology**. V. 17, p. 663-669, 2003.

BRUM, L. M. Atividade da NTPDase de linfócitos na dermatite de contato antes e após tratamento com dexametasona nanoestruturada. **Dissertação de Mestrado** – Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, RS. 2008.

CANDELARIO-JALIL, E. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: New experimental evidences. **Pharmacological Research**. V. 57, p. 266-273, 2008.

CEVC, G., BLUME, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradformable drug carriers, Transfersomes. **Biochymic and Biophysic Acta** V. 1514, p.191-205, 2008.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science Irlanda**. N. 163, p. 1161-1168, 2002.

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 Pharmaceutics**. V. 297, p. 134 -145, 2005.

CORNELIO, R.; MAYORGA, P. Study of cutaneous penetration of flurbiprofen. **Latin American Journal of Pharmacy**. V. 26 (6), p. 883-888, 2007.

CULLEN, L.; KELLY, L.; CONNOR, S. O.; FITZGERALD, D. J. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 287, p. 578-582, 1998.



DALMORA, M.E.A. Interação do piroxicam com microemulsão catiônica e  $\beta$ -ciclodextrina: Formulação *in vitro* e avaliação biológica. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Brasil. 1996.

DEGIM, Z.; ÇELEBİ, N.; SAYAN, H.; BABÜL, A.; ERDOĞAN, D.; TAKE, G. An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. **Amino Acids**. V. 22, p. 187-198, 2002.

DERLE, D. V.; SAGAR, B. S. H.; PIMPALÉ, R. Microemulsion as a vehicle for transdermal permeation of nimesulida. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.422, p. 622-625, 2006.

DHIR, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylentetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. **Seizure**. V. 16, p. 691-697, 2007.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; DUTTA, T.; NAHAR, M.; SARAF, D. K.; JAIN, N. K. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. **Journal of Controlled Release**. V. 123, p. 148-154, 2007.

EICKHOFF, W. M.; ENGERS, D. A.; MUELLER, K. R. Nanoparticulate NSAID composition. **Toxicology and Pharmacology**. V. 50, p. 283-289. 1995.

FAMAÉY, J. P. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulida: An overview. **Inflammation Research**. V. 46, p. 437-446, 1997.

FERREIRA, L. A. Desenvolvimento e avaliação da atividade anti-inflamatória de preparações tópicas contendo nimesulida. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. 2002.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1-4, 1989.

GIRAUDEL, J. M.; DIQUELOU, A.; LAROUTE, V.; LEES, P.; TOUTAIN, P. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of NSAIDs in a model of reversible inflammation in the cat. **British Journal of Pharmacology**. V. 146, p. 642 - 653, 2005.

GODESSART, N.; SALCEDO, C.; FERNANDEZ, A. G.; PATACIOS, J. M. Anti-inflammatory and gastrointestinal lesive effects of novel and classical NSAIDs in rats after acute and subacute treatments. **10th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds**. Viena, Áustria. p. 94, 1996.

GRAY, P.A.; WARNER, T.D.; VOJNOVIC, I.; DEL SOLDATO, P.; PARIKH, A.; SCADDING, G.K.; MITCHELL, J.A. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyclo-oxygenase and lipoxigenase activity in whole blood from aspirin-sensitive asthmatics vs healthy donors. **British Journal of Pharmacology**. V. 137, p. 1031-1038. 2002.

GUPTA, S. K.; PRAKASH, J.; JOSHI, A. S.; VELPANDIAN, T.; SENGUPTA, S. Anti-inflammatory activity of topical nimesulida gel in various experimental models. **Inflammation Research**. V. 45, p. 590-592, 1996.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M.; MAITRA, A. N. Polymeric nanoparticles encapsulating NSAIDs for ocular delivery: Corneal penetration and polymorphonuclear leucocyte migration studies. **European Cells and Materials**. V. 6, Suppl. 2, p. 40, 2003.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**. V.113, p. 57-65. 1995.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Ed Guanabara – Koogan. Rio de Janeiro-RJ, 1996.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. Ed. Guanabar-Koogan. 6ª ed. Rio de Janeiro – RJ, 1996.

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**. V. 86, p. 135-150, 2000.

HEGEN, M.; KEITH, J. C.; COLLINS, M.; NICKERSON-NUTTER, C. L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Rheumatic Diseases**. V. 67. p. 1505-1515, 2008.

HEILBORN, U.; BERGE, O.; ARBÖRELIUS, L.; BRODIN, E. Spontaneous nociceptive behaviour in female mice with Freund's complete adjuvant – and carrageenan – induced monoarthritis. **Brain Research**. V. 1143, p. 143-149, 2007.

HERNANDEZ, Micheline; FRESNEL, Marie-Madeleine. **Manual de Cosmetologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A. T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUEZ, R. A. F.; SOUZA, I. M. O.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 118, p. 361-366, 2008.

KHANDUJA, K. L.; SOHI, K. K.; PATHAK, C. M.; KAUSHIK, G. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. **Life Sciences**. V. 78, p. 1662-1669, 2006.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Current Medicinal Chemistry**. V. 9, p. 89-98, 2002.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclo-oxigenase – 2 (COX – 2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. V. 52:4 p. 498-512, 2002.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends Biotechnology**. V.16, p.307-321,1998.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacology**. V. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, J. L.; MUKHATAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 192, p. 294-306, 2003.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliações em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 37, n. 3, set/dez, 2001.

LIN, J., ZHANG, W., JONES, A., DOHERTY, M. Efficacy of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of the osteoarthritis: meta-analysis of randomized controlled trials. **British Medicin Journal**. V.329, p. 324-330, 2004.

LIU, J.; CHEN, H.; NI, Q.; XU,H.; YANG,X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 328, p. 191-195, 2006.

MANOSROI, A., JANTRAWUT ,P., MANOSROI, J. Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes with diclofenac diethylammonium. **International Journal of Pharmaceutics**.V.360, p. 156-163, 2008.

MILÃO, D. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. **Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre, 2001.

MOORE, B. C.; SIMMONS, D. L. – COX-2 Inhibition, Apoptosis, and Chemoprevention by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Current Medicinal Chemistry**. V. 7, p. 1131-1144, 2000.

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

MOURA, S. A. L. Desenvolvimento de modelo experimental para estudo do processo de cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em coelhos, utilizando extratos da própolis verde de Minas Gerais-Brasil. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa – MG, 2004.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructures lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 54, p. 131-155, 2002.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 58, p. 343-356, 2004.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; *et al.* Arachidonic acid cascade inhibitors modulate TPA-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase – 2 in leucocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.

NUNES, E. Radicais Livres: Conceito, Doenças, Estresse oxidativo e Antioxidantes. **Open Journal Systems**. p. 135, 2004.

PATTANAYAK, S. P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharm**. V. 120, p. 241-247, 2008.

POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; CRUZ, L.; SOARES, L.U.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Structural modelo f polymeric nanospheres indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**. V. 4, N. 5, 2007.

POTTS, R. O.; FRANCOEUR, M. L. Infrared spectrscopy of stratum corneum lipids: In vitro results and their relevance in the permeability. **Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement**. V. 81:(4), p. 123-129 1993.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipidic nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 357, p. 295-304, 2008.

RAINSFORD, K. D. Relationship of nimesulida safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. **Rheumatology**. V. 38, p. 4-10, 1999.

SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. **Fármacos para o tratamento da dor**. Ed Manole. 1ª Ed. São Paulo, 2008.

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

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 59, p. 427-433. 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. V. 26, Nº 5, p. 726-737, 2003.

SHAHIWALA, A.; MISRA, A. Studies in topical application niosomally entrapped nimesulida. **Journal of Pharmaceutcs Sciences**. V. 5 (3), p. 220-225, 2002.

SHAH, K.; DATE, A. A.; JOSHI, M.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoín: Potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 345. p. 163-171. 2007.

SHAKEEL, F., BABOOTA, S., AHUJA, A., *et al.* Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. **AAPS Pharmaceutics Sciences Technology**, V. 8 (4) 104, 2007.

SHIM, J., HANG, H. S., PARK, W., HAN, S., KIM, J., CHANG, I. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. V. 97, p. 477-484. 2004.

SILVA, A.P., SILVA, E.A., Blasquez, F.J.H., Keratinization in the development of mammal tegumental system – A revision of the literature. **Monografia de Especialização** Universidade de São Paulo – USP. 2007.

SOUTER AJ, FREDMAN B, WHITE PF - Controversies in the perioperative use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Anesthesiology**. V. 79:1178-1190, 1994.

STEENBERGEN, W. V.; PEETERS, P.; BONDT, J.; STAESSEN, D.; BÜSCHER, H.; LAPORTA, T.; ROSKAMS, T.; DESMET, V. Nimesulide-induced acute hepatitis: evidence from six cases. **Journal of Hepatology**. V. 29, p. 135-141, 1998.

STRAUSS, K. I. Antiinflammatory and neuroprotective of COX2 inhibitors in the injured brain. **Brain, Behavior and Immunity**. V. 22, p. 285-298, 2008.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.; ÖSTASAN, N.; SÜLEYMAN, B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. **Polish Journal of Pharmacology**. V. 56, p. 775-780, 2004.

SURI, S.S., FENNIRI, H., SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**. V. 2:16. 2007.

TANIGUCHI, Y.; YOKOYAMA, K.; INUI, K.; DEGUCHI, Y.; FURUKAWA, K.; NODA, K. Inhibition of brain cyclooxygenase-2 activity and the antipyretic action of nimesulida. **European Journal of Pharmacology**. V. 330, p. 221-229, 1997.

TOFANETTI, O.; CASCIARRI, I.; CIPOLLA, P. V.; CAZZULANI, P.; OMINI, C. Effect of nimesulide on cyclooxygenase activity in rat gastric mucosa and inflammatory exudate. **Medicin Sciences Research**. V. 17, p. 745-6, 1999.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**. V. 9 (2) N. 15, p. E128 - E147 2007.

TRAVERSA, G.; BIANCHI, C.; DA CAS, R.; ABRAHA, I.; MENNITI-IPPOLITO, F.; VENEGONI, M. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medicin Journal**. V. 327, p. 18-22, 2003.

VAJJA, B.N. L., JULURI, S., KUMARI, M., KOLE, L., CHAKRABARTI, R., JOSHI, V., D. Lipopolysaccharide – induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **Intern. Immunopharmacology**. V. 4, p.901-909, 2004.

VANE J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**. V. 231:232-235, 1971.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**. V. 38, p. 97-120, 1998.

WEDER, J. E.; DILLON, C. T.; HAMBLEY, T. W.; KENNEDY, B. J.; LAY, P. A.; BIFFIN, J. R.; REGTOP, H. L.; DAVIES, N. M. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. **Coordination Chemistry Reviews**. V. 232, p. 95-126, 2002.

WHITE, G. **Atlas Colorido de Dermatologia de Levene**. 2ªed. Ed. Artes Médicas, São Paulo – SP, 2000.

WHITTLE, B. J. R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental and Pharmacology**. V. 17, p. 301-313, 2003.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Biology and Medicin**. V. 111, p. 544-7, 1962.

WU, T. H.; YEN, F. L.; LIN, L. T.; TSAI, T. R.; LIN, C. C.; CHAM, T, M. Preparation, physicochemical, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 346, p. 160-168, 2008.

ZÀVIZOVÁ, V., KONERACKÁ, M., STRBAKÓ, *et al.* Encapsulation of indomethacin in magnetic biodegradable polymer nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. V.311, p. 379-382. 2006.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)