



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araraquara



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Andressa Maria Pironi

Dispersões sólidas de ácido ursólico veiculadas em hidrogéis para administração cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica *in vitro* e *in vivo*

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Araraquara - SP

2019

Andressa Maria Pironi

Dispersões sólidas de ácido ursólico veiculadas em hidrogéis para administração cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica *in vitro* e *in vivo*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Araraquara-SP

2019

P672d Pironi, Andressa Maria.
Dispersões sólidas de ácido ursólico veiculadas em hidrogéis para administração cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica *in vitro e in vivo* / Andressa Maria Pironi. – Araraquara, 2019.
124 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientador: Josimar de Oliveira Eloy.

1. Ácido ursólico. 2. Atividade anti-inflamatória. 3. Hidrogéis. 4. Dispersões sólidas. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Eloy, Josimar de Oliveira, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Absolutamente, não existem palavras que possam expressar todo o reconhecimento e gratidão às pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Porém, eu não poderia deixar de prestar uma pequena homenagem a todos àqueles que me ajudaram na construção desse importante fase em minha vida, a qual me proporcionou não apenas crescimento profissional, mas também amadurecimento pessoal.

Agradeço primeiramente a Deus que esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada. Eu não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que ele me enviou.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade tanto no estágio de graduação como no mestrado, pelo exemplo de ser humano e profissional. Por sempre me motivar, ensinar, respeitar e me encorajar para enfrentar medos e desafios. E principalmente por sua humildade e confiança no meu trabalho. Muito obrigada pela paciência e compreensão.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Josimar Oliveira Eloy pela atenção, suporte, paciência e disponibilidade para colaborar imensamente no desenvolvimento deste trabalho, além da sua amizade.

Aos meus familiares, especialmente a minha avó Florinda P. Pironi, a minha irmã Isabela D. Pironi, ao meu pai Luis A. Pironi e ao meu namorado Luciano Olivati por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim. Por todo amor, carinho, apoio, incentivo e ensinamentos que me forneceram base necessária para vencer mais esta etapa. E, sobretudo, pela confiança que sempre depositaram em mim.

A todos os meus colegas de trabalho do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho, em especial à Fernanda Boni, Valéria Cardoso, Natália G. dos Santos, Natália Noronha e à amável Dona Neusa. Principalmente aos que se tornaram mais do que colegas, aos amigos Eliete Von Zuben, Francesca Victorelli, Camila Rodero, Vivian Ruz, Mariana Sato, Paula Scanavez, Leda Robusti, Patrícia Bento, Márcia Oyafuso, Patrícia Rocha, Karen Santos, Aline Perissinato e Bruno Fonseca, muito obrigada por tornarem os meus dias mais divertidos, por dividirem comigo as angústias e alegrias e por todo carinho e amizade.

À Dr.^a Selma Gutierrez Antonio pela satisfatória e imensa colaboração nas análises de difração de raios-X que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. E também à simpática e prestativa técnica Neide Ferruci.

Ao amigável Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro pela colaboração nas análises de calorimetria exploratória diferencial que também foi importante para realização deste trabalho. E ao seu prestativo aluno de mestrado Jovan Duran pela ajuda nas análises e por compartilhar seu conhecimento.

À gentil Prof.^a Dr.^a Leila Aparecida Chiavacci Favorin e à querida Prof.^a Dr.^a Herida Regina Nunes Salgado pela parceria na utilização dos equipamentos. Aos alunos do laboratório CMAF e aos alunos do laboratório de Controle de Qualidade. E também gostaria de agradecer imensamente às técnicas Maria de Fátima e Mariluci. Muito obrigada pela atenção, paciência e assistência.

À Prof.^a Dr.^a Natália Valadares de Moraes, à amável Prof.^a Dr.^a Rosangela Gonçalves Peccinini e ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela parceria na utilização de equipamentos. A todos os técnicos do Laboratório de Toxicologia, em especial ao Vinícius P. Silva e a Valéria Alves, muito obrigada pelos ensinamentos sobre Cromatografia.

Aos professores de Farmacotécnica Dr.^a Palmira D. Gremião; Dr. Anselmo G. Oliveira e Dr.^a Beatriz Stringhetti Ferreira Cury pela parceria na utilização dos equipamentos, pelas contribuições e amizade.

À Prof.^a Dr.^a Sandra Helena Pulcinelli por permitir a utilização do espectrômetro e à querida técnica Danúbia Gava pelo treinamento e assistência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dessa pesquisa e auxílio financeiro, sob Processo nº 2016/22544-0 (Brasil) e sob processo nº 2018/17768-2 (Exterior).

Ao pessoal da Seção Técnica de Pós-Graduação que sempre foram muito atenciosos e prestativos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. À Prof.^a Dr.^a Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, Coordenadora do Programa de Ciências Farmacêuticas e aos demais membros do programa.

À amável Prof.^a Dr.^a Ana Melero Zaera pela oportunidade e por me receber em seu laboratório com muita gentileza durante o estágio de pesquisa que realizei na Universidade de Valência, Espanha. Agradeço também ao seu prestativo e atencioso aluno de pós-doutorado Antonio J. Guillot que me auxiliou durante os ensaios.

Enfim...

Muito obrigada de coração a todos que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, uma vez que “ninguém é capaz de fazer pesquisa sozinho”.

RESUMO

A inflamação cutânea envolve a liberação de vários mediadores inflamatórios, os quais quando em excesso podem ser nocivos e causar o desenvolvimento de doenças inflamatórias e crônicas de pele. O fator nuclear kappa B (NF- κ B) exerce um papel fundamental na produção de citocinas e outras proteínas pró-inflamatórias, portanto, o desequilíbrio dessa via celular está associado à patogênese dos distúrbios inflamatórios na pele. O ácido ursólico é um triterpenóide de ocorrência natural com propriedades anti-inflamatórias que resultam na supressão de mediadores inflamatórios via inibição da ativação do NF- κ B, sendo um candidato para o tratamento de inflamações cutâneas. Entretanto, essa molécula apresenta baixa solubilidade em água o que limita sua aplicação terapêutica. Neste contexto, o desenvolvimento de dispersões sólidas (DS) constituídas de polivinilpirrolidona K-30 e tensoativos, como poloxamer 407 ou D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) representa uma estratégia para aumentar a sua solubilidade. Além disso, a veiculação das DS em um hidrogel à base de poloxamer pode viabilizar a administração tópica do fármaco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar DS de ácido ursólico constituídas por PVP K-30 e TPGS/P407 incorporadas em um hidrogel, além de avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a atividade anti-inflamatória *in vivo* desses sistemas. Os resultados obtidos revelaram que ambas as DS aumentaram significativamente a solubilidade aquosa do fármaco. Conforme os dados obtidos a partir das análises de difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial, o aumento da solubilidade demonstrou estar relacionado com a dispersão do AU na matriz polimérica na forma molecular ou no estado amorfo. Os hidrogéis de poloxamer demonstraram adequadas propriedades mecânicas e bioadesivas para administração cutânea. Ainda, as análises reológicas evidenciaram comportamento pseudoplástico para os hidrogéis, o que é desejável para formulações de uso tópico. Além disso, as DS e os hidrogéis contendo ambas as DS retardaram o perfil de liberação do ácido ursólico. A partir do estudo de permeação cutânea *in vitro* e quantificação do fármaco nas camadas da pele, verificou-se que a DS16 ao ser incorporada no hidrogel, proporcionou um menor fluxo de fármaco ($12,48 \pm 1,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) através da pele, enquanto para o hidrogel contendo a DS2 não houve a permeação após 30 horas de ensaio. Ainda, foi observado para todas as formulações desenvolvidas que o AU se acumulou mais na epiderme do que no estrato córneo, isto é particularmente evidente para as DS16. O ácido ursólico bem com os hidrogéis com as dispersões sólidas demonstraram-se biocompatíveis frente à linhagem celular L929 (fibroblastos). Os resultados da avaliação do efeito anti-inflamatório *in vivo* revelaram que para as DS a atividade anti-inflamatória foi significativamente maior quando ambas foram aplicadas incorporadas nos hidrogéis de poloxamer, reduzindo 41,87% e 56,64% do edema induzido por aplicação tópica de óleo de cróton. Portanto a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os sistemas desenvolvidos demonstram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas de pele.

Palavras-chave: Ácido ursólico, Atividade anti-inflamatória, Hidrogéis, Dispersões sólidas.

ABSTRACT

Cutaneous inflammation involves the release of several inflammatory mediators, which when excess can be harmful and cause the development of inflammatory and chronic skin diseases. Nuclear factor kappa B (NF- κ B) plays a key role in the production of cytokines and other proinflammatory proteins, so imbalance of this cellular pathway is associated with the pathogenesis of inflammatory skin disorders. Ursolic acid (UA) is a naturally-occurring triterpenoid with anti-inflammatory properties that result in the suppression of inflammatory mediators via inhibition of NF- κ B activation and is a promising candidate for the treatment of cutaneous inflammations. However, this molecule presents low solubility in water, which limits its therapeutic application. In this context, the development of solid dispersions (SD) consisting of polyvinylpyrrolidone k-30 and surfactants, such as poloxamer 407 or D- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) appears as a strategy to improve their solubility. In addition, SD conveyed in a poloxamer-based hydrogel may enable topical administration of the drug present in SD. The objective of this work was to develop and characterize SD of ursolic acid constituted by PVP K-30 and TPGS / P407 carried in a hydrogel, in addition to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* anti-inflammatory activity of these systems. The results obtained revealed that both solid dispersions significantly increased the aqueous solubility of the UA. According to the data obtained from X-ray diffraction and differential scanning calorimetry, the increase in solubility has been shown to be related to the dispersion of UA in the polymer matrix in molecular or amorphous form. Poloxamer hydrogels and subsequent incorporation of DS demonstrated adequate mechanical and bioadhesive properties for skin delivery. Furthermore, rheological analyzes showed a pseudoplastic behavior for all hydrogels, whose performance is desirable for topical formulations. In addition, SD, hydrogels with the drug, and hydrogels containing SD controlled release of the ursolic acid. *In vitro* cutaneous permeation study and quantification of the drug in the skin layers, it was found that SD16, when formulated in hydrogel, provided a lower drug flow ($12.48 \pm 1.48 \mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$) through the skin, whereas for the hydrogel containing SD2 there was no permeation after 30 hours of test. Furthermore, it has been observed for all formulations developed that UA has accumulated more in the epidermis than in the stratum corneum, this is particularly evident for the SD16. Free ursolic acid and hydrogels with the solid dispersions were shown to be biocompatible against the L929 cell line (fibroblasts). The results of the evaluation of the anti-inflammatory effect *in vivo* revealed that for the SD the anti-inflammatory activity was significantly higher when both were applied incorporated in the poloxamer hydrogels, reducing 41.87% and 56.64% of the edema induced by topical application of croton oil. Therefore from the results obtained it can be concluded that the systems developed prove to be an interesting and innovative approach for the treatment of chronic inflammatory skin diseases.

Keywords: Ursolic acid. Anti-inflammatory activity. Hydrogels. Solid dispersions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das camadas da pele e seus anexos.....	20
Figura 2. Possíveis vias de permeação de fármaco.....	24
Figura 3. Estrutura química do ácido ursólico.....	28
Figura 4. Estrutura química da polivinilpirrolidona (PVP).....	33
Figura 5. Estrutura química do poloxamer, (a) monômeros de oxietileno e (b) monômeros de oxipropileno.....	34
Figura 6. Estrutura química do D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS).....	35
Figura 7. Incubação da pele a temperatura de 32°C por 4 horas antes do procedimento de tape stripping.....	50
Figura 8. Representação do experimento <i>in vivo</i> de edema de orelha induzido por aplicação tópica de óleo de cróton.....	53
Figura 9. Cromatograma do ácido ursólico obtido pelo método cromatográfico proposto.....	55
Figura 10. Cromatograma da acetonitrila (a); Cromatograma da água (b); Cromatograma das DS constituídas por PVP K-30 e TPGS sem AU (c); Cromatograma das DS constituídas por PVP K-30 e P407 sem AU (d).....	55
Figura 11. Curva analítica do ácido ursólico em acetonitrila. Fase móvel: 88:12 (v/v) acetonitrila: água; Coluna: C18 (4,6 mm x 250mm; 5 μ m) fluxo: 0,95 mL/min.; λ : 203 nm; Injeção: 20 μ L; 25°C.....	57
Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula das dispersões sólidas.....	62
Figura 13. Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados versus resposta) para a solubilidade.....	65
Figura 14. Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados versus resposta) para teor (%).	65
Figura 15. Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados versus resposta) para o diâmetro de partícula.....	66
Figura 16. Solubilidade aquosa de misturas físicas e dispersões sólidas.....	69
Figura 17. Fotomicrografia do ácido ursólico, no aumento de 4.000x (A) e 14.000x (B).....	70
Figura 18. Fotomicrografia das dispersões sólidas sem o fármaco DS_2 (C) e DS_16 (E) e com fármaco DS2_AU (D) e DS16_AU (E) no aumento de 50x.....	70

Figura 19. Difratomogramas de raios-X do ácido ursólico do presente estudo (A) e obtido por ZHOU <i>et al.</i> (2015).....	73
Figura 20. Difrátograma de raios-X do ácido ursólico (AU), poloxamer 407 (P407), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2 (MF_2), dispersão sólida 2 (DS_2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS_5).....	73
Figura 21. Difrátograma de raios-X do ácido ursólico (AU), D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 16 (MF_16), dispersão sólida 16 (DS_16), mistura física 15 (MF_15) e dispersão sólida 15 (DS_15).....	74
Figura 22. (A) Curva de DSC do ácido ursólco realizada no presente estudo a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. (B) Curva de DSC da forma I do AU obtida por ZHOU <i>et al.</i> (2015) estudada a diferentes taxas de aquecimento: (f) 5°C/min; (g) 30°C/min; (h) 50°C/min; (i) 99,9 °C/min.....	76
Figura 23. Curvas de DSC do ácido ursólico (AU), poloxamer (P407), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2 (MF_2) e dispersão sólida 2 (DS2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS5).....	77
Figura 24. Curvas de DSC do ácido ursólico (AU), D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2 (MF_2) e dispersão sólida 2 (DS2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS5).....	77
Figura 25. Difrátograma de raios-x da dispersão sólida DS_2 (A) e DS_16 (B) após estudo de estabilidade a temperatura de 30 \pm 2°C e humidade relativa de 60 \pm 5%.....	79
Figura 26. Fotografia do hidrogel de poloxamer (A); hidrogel de poloxamer + NaCl (B); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 2 sem fármaco (C); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 16 sem fármaco (D); hidrogel de poloxamer + NaCl com ácido ursólico (E); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 2 com fármaco (F) e hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 16 com fármaco (G).....	80
Figura 27. Fotomicrografia dos hidrogéis com ou sem fármaco e com ou sem as dispersões sólidas incorporadas HP_NaCl (A), HP_NaCl_AU (B), HP_NaCl_DS2 (C), HP_NaCl_DS2_AU (D), HP_ NaCl_DS16 (E), HP_ NaCl_DS16_AU (F), no aumento de 50x.....	81
Figura 28. Difrátograma de raios-X dos hidrogéis (A) e difratograma de raios-X do fármaco e os polímeros isolados da formulação.....	83
Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento “ <i>shear stress</i> ” e taxa de cisalhamento “ <i>shear rate</i> ” a temperatura de 25 \pm 0,5°C (A) e 37 \pm 0,°C (B). Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e símbolos vazios às curvas descendentes.....	85
Figura 30. Reogramas de variação do módulo de armazenamento G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência.....	87
Figura 31. Temperatura de transição de fase sol-gel dos hidrogéis obtidos com e sem fármaco e	

dispersões sólidas.....	89
Figura 32. Perfil de textura do hidrogel de poloxamer (HP) e HP adicionados de NaCl (HP_NaCl); HP_NaCl contendo as DS sem o fármaco (HP_NaCl_DSF2) e (HP_NaCl_DSF16); HP_NaCl com as DS com fármaco (HP_NaCl_DSF2_AU) e (HP_NaCl_DSF16_AU).....	91
Figura 33. Força e trabalho máximo bioadesivo dos hidrogéis á temperatura de $32 \pm 0,5$ °C.....	92
Figura 34. Cromatograma do AU em meio receptor (a); Cromatograma do meio receptor (b); Cromatograma da DSF2 sem fármaco (c); Cromatograma da DSF16 sem o fármaco (d) e Cromatograma do HP_NaCl sem fármaco (e).....	93
Figura 35. Curva de calibração do ácido ursólico em meio receptor. Fase móvel: 90:10 (v/v) acetonitrila:solução de ácido acético 0,5 % (v/v) pH 3,5 ; Coluna: C18 (4,6 mm x 250mm; 5µm) fluxo: 1,0 mL/min.; λ: 203 nm; Injeção: 20µL; 28°C.....	94
Figura 36. Perfil de liberação do ácido ursólico a partir de dispersões sólidas e hidrogéis após 24 horas de análises.....	95
Figura 37. Perfil de permeação (média ± desvio padrão) do ácido ursólico livre e a partir DS_2, DS_16 e HP_DS16 através da epiderme em 30 horas de estudo.....	99
Figura 38. Quantidade de fármaco recuperada (µg) nos aparatos, estrato córneo e epiderme após tape- stripping e estudo de retenção cutânea.....	102
Figura 39. Efeito anti-inflamatório tópico do ácido ursólico livre ou incorporado nas dispersões sólidas e/ou hidrogéis desenvolvidos em edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de dispersões sólidas disponíveis no mercado.....	32
Tabela 2. Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas de AU.....	41
Tabela 3. Nomenclatura e abreviação dos hidrogéis desenvolvidos.....	44
Tabela 4. Grau de citotoxicidade das formulações a partir do método de difusão em agar.....	52
Tabela 5. Parâmetros estudados para avaliar a conformidade do sistema cromatográfico empregado para análise do AU.....	54
Tabela 6. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de AU.....	56
Tabela 7. Precisão intracorrída do método analítico para análise de AU.....	57
Tabela 8. Precisão intermediária do método analítico para análise de AU.....	58
Tabela 9. Exatidão do método analítico para análise de AU nas DS constituídas por PVP-K30 e TPGS.....	58
Tabela 10. Exatidão do método analítico para análise de AU nas DS constituídas por PVP-K30 e P407.....	58
Tabela 11. Robustez do método analítico para análise de AU.....	59
Tabela 12. Planejamento fatorial completo (2^4) para obtenção de dispersões sólidas.....	59
Tabela 13. Dispersões sólidas selecionadas para as análises subsequentes.....	68
Tabela 14. Teor de ácido ursólico presente nas dispersões sólidas selecionadas.....	69
Tabela 15. Contéudo de fármaco (teor %) das dispersões sólidas DS_2 e DS_16 após estudo de estabilidade a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 5\%$	80
Tabela 16. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) e regressão linear (R) a temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$	86
Tabela 17. Valores de G' e G'' da análise oscilatória para os hidrogéis a temperatura de $25 \pm 0,5$ e $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$	88
Tabela 18. Valores do expoente viscoelástico (n) resistência do gel (S) e da regressão linear (R) para as formulações estudadas.....	88
Tabela 19. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva	

analítica de AU em meio receptor.	94
Tabela 20. Estudo de solubilidade do fármaco em meio receptor.....	94
Tabela 21. Percentual de AU liberado a partir das formulações após 24 horas de ensaio...96	
Tabela 22. Valores de R quadrado referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação <i>in vitro</i> do AU a partir das formulações obtidas.....	97
Tabela 23. Parâmetros cinéticos obtidos da permeabilidade do ácido ursólico através da pele após a administração de DS_2, DS_16 e HG_DS2 e HG_DS16.....	100
Tabela 24. Medidas de extensão das áreas descoradas (halo).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AU: ácido ursólico
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CMD: concentração média determinada
Df: diâmetro de Feret
DMEM: Dulbecco modified Eagle medium
DRX: Difração de raios X
DP: desvio padrão
DPR: desvio padrão relativo
DSC: Calorimetria exploratória diferencial
DS: dispersões sólidas
EHL: equilíbrio hidrófilo lipófilo
EROS: espécies reativas de oxigênio
 ΔH = entalpia de fusão
F:P:T: fármaco: polímero: tensoativo
HP: hidrogel de poloxamer
IC: inclinação da curva
IkB: proteínas inibitórias kappa B
IL: interleucinas
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
MF: misturas físicas
NaCl: cloreto de sódio
NF- κ B: Fator Nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
P407: poloxamer 407
PVP-k30: polivinilpirrolidona k-30
rpm: rotações por minuto
TNF α : fator de necrose tumoral alfa
TPA: análise do perfil de textura das formulações
TPGS: D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Pele Humana.....	21
2.1.1. Camada basal	22
2.1.2. Camada escamosa ou espinhosa	22
2.1.3. Camada granulosa.....	22
2.1.4. Camada córnea	23
2.2. Administração cutânea de fármacos	23
2.2.1. Vias de difusão de moléculas através da pele.....	24
2.2.1.1. Via transepidérmicas	24
2.2.1.2. Vias de derivação.....	25
2.2.2. Métodos ativos e passivos de administração cutânea.....	25
2.2.2.1. Passivos	25
2.2.2.2. Ativos	26
2.3. Doenças cutâneas.....	27
2.3.1. Psoríase.....	27
2.3.2. Dermatite atópica.....	27
2.4. Ácido ursólico	28
2.5. Dispersões sólidas	30
2.5.1. Métodos de obtenção de dispersão sólida.....	31
2.5.2. Carreadores.....	33
2.5.2.1. Polivinilpirrolidona.....	34
2.5.2.2. Poloxamer	35
2.5.2.3. D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS)	36
2.6. Hidrogéis	36
3. OBJETIVO	38
3.1. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Materiais	38
4.2. Métodos	39
4.2.1. Validação de método analítico para análise quantitativa de ácido ursólico em dispersões sólidas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
4.2.1.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	40
4.2.1.2. Seletividade	40
4.2.1.3. Linearidade	40
4.2.1.4. Limite de detecção.....	40

4.2.1.5. Limite de quantificação	41
4.2.1.6. Precisão.....	41
4.2.1.7. Exatidão	41
4.2.1.8. Robustez	41
4.2.2. Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas de AU.....	42
4.2.2.1. Preparo das dispersões sólidas nas condições selecionadas com base no planejamento fatorial	43
4.2.2.2. Preparo e obtenção das misturas físicas	44
4.2.2.3. Determinação do teor de fármaco nas dispersões sólidas.....	44
4.2.2.4. Estudo de solubilidade do ácido ursólico nas dispersões sólidas.	44
4.2.2.5. Análise do tamanho das partículas de dispersões sólidas.....	44
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.2.4. Difração de raios-X (DRX)	45
4.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	45
4.2.6. Estabilidade físico-química das dispersões sólidas	45
4.2.7. Preparo e obtenção dos hidrogéis de poloxamer	45
4.2.8. Incorporação do AU livre e das dispersões sólidas no hidrogel.....	46
4.2.9. Análises Reológicas.....	46
4.2.9.1 Ensaio reológico contínuo	46
4.2.9.2 Ensaio reológico oscilatório	47
4.2.10. Determinação da temperatura de transição de fase sol-gel dos hidrogéis	47
4.2.11. Análise do perfil de textura dos hidrogéis	47
4.2.12. Estudo de Bioadesão <i>in vitro</i>	48
4.2.13. Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	48
4.2.13.1. Análise quantitativa do ácido ursólico nos ensaios de liberação.....	48
4.2.13.2. Determinação da solubilidade do ácido ursólico em solução receptora.....	48
4.2.13.3. Perfil de liberação do ácido ursólico <i>in vitro</i>	49
4.2.14. Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i>	49
4.2.14.1. Cálculo dos parâmetros cinéticos de permeação	50
4.2.15. Avaliação da penetração cutânea <i>in vitro</i>	51
4.2.16. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	52
4.2.17. Avaliação da atividade inflamatória <i>in vivo</i>	54
4.2.17.1. Animais.....	54
4.2.17.2. Experimento	54
4.2.18. Análises Estatísticas	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Validação de método analítico para análise quantitativa de ácido ursólico	56

5.1.1 Conformidade do sistema cromatográfico.....	56
5.1.2. Seletividade	57
5.1.3. Linearidade	58
5.1.4. Precisão.....	59
5.1.5. Exatidão	60
5.1.6. Limite de detecção e Limite de quantificação.....	60
5.1.7. Robustez	60
5.2. Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas.	61
5.2.1. Estudo de solubilidade do AU nas dispersões sólidas.....	62
5.2.2. Determinação do teor de fármaco nas dispersões sólidas.....	63
5.2.3. Análise da distribuição de tamanho das partículas de dispersões sólidas.	63
5.2.4. Efeito das variáveis nas respostas.....	66
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	71
5.4. Difração de raios –X.....	73
5.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	76
5.6. Estabilidade físico-química das dispersão sólidas.....	80
5.7. Caracterização dos hidrogéis	82
5.7.1. Análise macroscópica dos hidrogéis	82
5.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	83
5.7.3. Difração de raios –X dos hidrogéis	84
5.7.4. Análises reológicas dos hidrogéis.....	85
5.7.4.1. Ensaio reológico contínuo	85
5.7.4.2. Ensaio reológico oscilatório	88
5.7.4.3. Determinação da temperatura de transição de fase sol-gel.....	90
5.7.5. Análise do Perfil de Textura.....	92
5.7.6. Estudo de Bioadesão <i>in vitro</i>	93
5.8. Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	94
5.8.1. Seletividade	94
5.8.2. Linearidade	95
5.8.3. Estudo de solubilidade do fármaco em meio receptor.....	96
5.8.4. Perfil de Liberação <i>in vitro</i> do ácido ursólico	97
5.9. Experimentos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	99
5.10. Avaliação da penetração cutânea <i>in vitro</i>	102
5.11. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	103
5.12. Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	104
6. CONCLUSÃO.....	107

REFERÊNCIAS	108
--------------------------	------------

1.INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, além de exercer as funções de barreira, atuar na termorregulação, a pele também possui um papel fundamental na proteção imunológica do organismo (SAMPAIO *et al.*, 2000). A interação coordenada entre os diferentes tipos de células presentes nas suas camadas permite a geração de uma resposta inflamatória imediata frente a estímulos nocivos físicos, químicos e biológicos (WILLIAMS *et al.*, 1996).

O processo inflamatório na pele é gerado e mantido pela liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo metabólitos do ácido araquidônico, aminas vasoativas, citocinas (IL, TNF- α), óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio (BUCKLE *et al.*, 1997). A interação dessas citocinas com os seus respectivos receptores nas células, produz segundos mensageiros responsáveis pela ativação celular de proteínas quinases (BHAGWAT *et al.*, 1999).

As proteínas quinases, uma vez ativadas, promovem a fosforilação e degradação de proteínas inibitórias kappa B (I κ B), permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo e conseqüentemente a transcrição gênica de diversas proteínas inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, as quais modulam, mantêm e amplificam a inflamação (BARNES *et al.*, 1997). Assim, como a ativação de NF- κ B está associada à inflamação, uma molécula capaz de impedir a sua ativação torna-se uma candidata promissora para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, como dermatite atópica e psoríase (CHECKER *et al.*, 2012).

Os corticosteróides tópicos são os anti-inflamatórios mais empregados no tratamento dessas desordens cutâneas, devido a sua ação anti-inflamatória e imunossupressiva (GOTTLIEB, 2005). Entretanto, o uso contínuo desses medicamentos é acompanhado de efeitos adversos, como atrofia cutânea, telangiectasias, púrpura, hipertricose, síndrome de Cushing (RATHI *et al.*, 2012). Portanto, o emprego de novas moléculas isoladas a partir de fontes naturais pode ser interessante para otimizar o tratamento terapêutico de doenças inflamatórias crônicas de pele.

O ácido ursólico é um triterpenóide pentacíclico que pode ser obtido a partir de diversas plantas medicinais(LIU, 2005). Esse composto tem atraído grande interesse em função dos seus diversos efeitos terapêuticos, incluindo atividade antioxidante, anti-

neoplásica e anti-inflamatória (RAMACHANDRAN, 2008; IKEDA *et al.*, 2008; OVESNA *et al.*, 2006). De acordo com os estudos apresentados na literatura (CHECKER *et al.*, 2012; MICELI *et al.*, 2005; RYU *et al.*, 2000; SUH *et al.*, 1998; LIU, 1995; NAJID *et al.*, 1992), o mecanismo envolvido na atividade anti-inflamatória do AU têm sido atribuído à inibição ou redução de diferentes mediadores inflamatórios, tais como a liberação de histamina, a secreção de citocinas (IL-1 β e TNF- α), a atividade da 5 lipoxigenase, da elastase e a síntese de NO e PGE2 principalmente via inibição do NF- κ B.

No entanto, apesar da potente atividade anti-inflamatória dessa molécula, a sua baixa solubilidade em meio aquoso limita a sua aplicação terapêutica (LIU, 2005; US EPA, 2009). Diversas estratégias podem ser empregadas para melhorar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, tais como a redução do tamanho de partículas, modificações químicas da molécula, formação de sal, ajuste de pH e incorporação de fármacos em sistemas de liberação poliméricos ou lipídicos, como lipossomas, nanopartículas e dispersões sólidas (ELOY *et al.*, 2014).

As dispersões sólidas podem ser definidas como sistemas em que o fármaco encontra-se disperso no estado molecular ou amorfo em uma matriz biologicamente inerte (SETHIA *et al.*, 2003). O aumento da solubilidade de fármacos em DS pode ser atribuído a diversos fatores, como a redução do tamanho das partículas, a aglomeração reduzida, melhor molhabilidade, e principalmente a conversão de um fármaco no estado cristalino para o amorfo (CRAIG, 2002).

Os polímeros hidrofílicos, tais como os polietilenoglicóis e polivinilpirrolidonas geralmente são os mais empregados para obtenção de DS, pois aumentam a solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis em meio aquoso (FRANCO *et al.*, 2001). Os agentes tensoativos também vêm sendo empregados como carreadores, pois além de promover uma melhora acentuada da solubilidade de fármacos, evita o processo de recristalização dos mesmos, o qual é considerado um problema de estabilidade característico das DS (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os tensoativos não iônicos são mais hidrofóbicos do que os iônicos e são menos tóxicos para as membranas biológicas (BOGMAN *et al.*, 2003). O poloxamer 407 (P407) e o D- α -tocoferil polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) são exemplos de tensoativos não iônicos, empregados com sucesso como veículos na obtenção de DS (ELOY *et al.*, 2014, BHISE, 2011; SETHIA *et al.*, 2004; EERDENBRUGH *et al.*, 2009).

As formulações semi-sólidas que apresentam consistência e confere maior tempo de retenção no local, como os hidrogéis podem viabilizar a administração tópica do fármaco a partir das dispersões sólidas.

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais formadas por macromoléculas interligadas por meio de interações físicas ou ligações covalentes (PEPPAS, 1986). Entre as principais características desse sistema estão a sua habilidade de absorver grande quantidade de líquidos sem se dissolver, alta porosidade e liberação controlada de fármacos (HOFFMAN, 2002). Dentre os polímeros empregados para obtenção do hidrogel, destaca-se o poloxamer 407 em função das suas propriedades termorresponsivas que favorecem a incorporação das dispersões sólidas, uma vez que abaixo da temperatura crítica micelar, o polímero encontra-se em solução e acima se torna um hidrogel (PASSERINI *et al.*, 2006; RAMYA DEVI *et al.*, 2013).

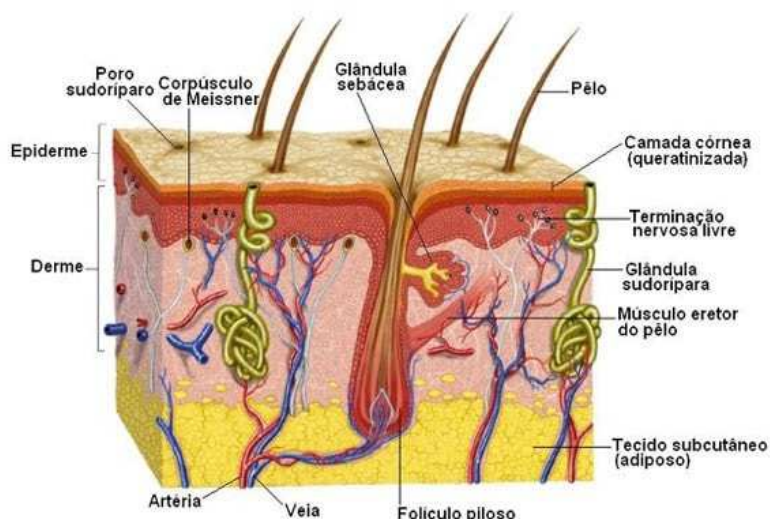
Portanto, o desenvolvimento de dispersões sólidas constituídas de polivinilpirrolidona k-30 e poloxamer 407 ou D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato, veiculadas em hidrogéis para administração cutânea de ácido ursólico, representa uma estratégia inovadora e interessante para o tratamento de doenças inflamatórias de pele, como psoríase e dermatite atópica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pele Humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea e representa 15% do peso corporal (HAAKE *et al.*, 2001). A principal função desse órgão está relacionada com seu papel de barreira que promove a proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos. Ademais, possui função na termorregulação, hidratação e proteção imunológica do organismo (KANITAKIS, 2002). As três camadas que compõe a pele são a epiderme, a derme e tecido subcutâneo, como ilustrado na figura 1.

Figura 1. Representação das camadas da pele e seus anexos.



Fonte: VAN DE GRAFF (2003)

O tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele que se localiza subjacente á derme. As abundantes células adiposas presentes nesta camada funcionam como depósitos de energia e também possuem papel na manutenção da homeotermia e proteção física dos órgãos internos (SEELEY *et al.*, 2003). Além disso, os apêndices cutâneos, como as glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e folículos pilosos se originam a partir dessa camada da pele (PRISTA *et al.*, 2008).

A derme é considerada a camada intermediária da pele que acomoda terminações nervosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, melanócitos, receptores sensoriais e apêndices cutâneos (CARROLL, 2007). Essa camada é constituída por tecido conjuntivo fibroso, filamentosos e amorfo, dessa forma, os seus

componentes principais são as fibras de elastina e colágeno que fornecem elasticidade e resistência à pele (KOLARSICK *et al.*, 2006). O ácido hialurônico embora esteja presente em menor quantidade na derme normal também contribui para sustentação da mesma (JAMES *et al.*, 2006).

A epiderme consiste em uma camada de epitélio estratificado, composta principalmente por queratinócitos (80% das células) e também por outros tipos celulares, incluindo as células dendríticas, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (SUH *et al.*, 2014). Os queratinócitos atuam na síntese de queratina, uma proteína com função protetora. A epiderme é dividida em quatro regiões: camada de células basais, camada de células escamosas, camada de células granulares e camada de células córneas (estrato córneo) conforme a morfologia e posição dos queratinócitos à medida que se diferenciam em células córneas (JAMES *et al.*, 2006).

2.1.1. Camada basal

A camada celular basal também conhecida como camada germinativa é constituída por queratinócitos, melanócitos e células de Merkel. A camada mais inferior da epiderme se localiza sobre a membrana basal, a qual separa a derme da epiderme. Os queratinócitos presentes nessa camada apresentam forma cilíndrica ou colunar, pois são empurrados para superfície da epiderme devido à produção constante de novas células. As células basais se aderem umas às outras, assim como as células mais superficiais por meio de junções desmossomáticas (MURPHY, 1997). A migração de células da camada basal para camada córnea pode levar em torno de 14 dias (CHU, 2008).

2.1.2. Camada escamosa ou espinhosa

Esta camada localiza-se sobre a camada basal e é composta por cerca de 5-10 camadas de células poligonais ou multifacetadas. Os espaços entre as células espinhosas são amplamente preenchidos por desmossomos, os quais mantêm as células unidas oferecendo resistência ao estresse (MURPHY, 1997). As junções intercelulares epidérmicas também são constituídas por junções de intervalo. Estas junções formam um poro entre as células que possibilita a comunicação via sinais químicos que é essencial para regulação do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (CAPUTO e PELUCHETTI, 1977).

2.1.3. Camada granulosa

A camada granulosa é a camada mais superficial da epiderme que ainda contém células vivas. O aspecto granuloso dessa camada é devido à presença de células achatadas que contém grande quantidade de grânulos de querato-hialina em seu citoplasma, os quais são responsáveis pela síntese e modificação de proteínas envolvidas no processo de queratinização (CHU, 2008). Enzimas lisossomais são encontradas em maior quantidade na camada granulosa do que na camada basal e espinhosa, uma vez que essa camada é a região de queratogênese da epiderme (KOLARSICK *et al.*, 2011).

2.1.4. Camada córnea

A camada córnea (CC) é a camada mais superficial da epiderme, constituída principalmente por proteínas insolúveis (70%) e lipídios (20%) (WALTERS, 2002). Os lipídios encontram-se retidos nos espaços extracelulares, onde se organizam na forma de membranas lamelares que circundam os corneócitos e originam uma matriz (ELIAS, 1991). Esses lipídios evitam a perda excessiva de água do corpo, dificultam a entrada da maioria dos fármacos hidrofílicos administrados pela via tópica e ainda podem atuar como um “reservatório”, no qual fármacos hidrofóbicos podem ser acumulados (PRAUSNITZ *et al.*, 2012). Além disso, a composição e distribuição das ceramidas, colesterol e os ácidos graxos livres na CC também contribuem de maneira efetiva para sua função de barreira (NAIK *et al.*, 2000).

2.2. Administração cutânea de fármacos

A pele possui vantagens significativas na prática clínica como via de administração de fármacos tanto para atingir um efeito local quanto para obter um efeito sistêmico, visto que apresenta grande área para absorção, administração fácil e não invasiva e ainda o processo de absorção pode ser modulado ou até mesmo interrompido para reduzir efeitos colaterais indesejáveis (HAN e DAS, 2015).

A entrega tópica de fármacos é definida como o direcionamento do fármaco para locais afetados do tecido cutâneo garantindo uma absorção sistêmica mínima. Essa estratégia é importante para o tratamento de doenças dermatológicas, como câncer de pele, psoríase, eczema e infecções microbianas, onde o sítio da doença está localizado diretamente na pele (BROWN *et al.*, 2008).

A administração transdérmica de fármacos refere-se à difusão do fármaco através de várias camadas da pele para atingir a circulação sistêmica, essa abordagem é interessante para alguns fármacos como nicotina, nitroglicerina, estrogênios e outros utilizados em terapias

crônicas (PRAUSNITZ e LANGER, 2009; PASTORE *et al.*, 2014). Além disso, essa via também tem sido utilizada para entrega de anestésicos e diversos fármacos biológicos, como as vacinas (KOCHHAR *et al.*, 2013; ITA, 2016).

Em relação à via oral que é um via convencional para administração de fármacos, a via de administração cutânea oferece vantagens adicionais para determinados fármacos, tais como evita o efeito de primeira passagem no intestino e fígado, impede flutuações dos picos plasmáticos e também a degradação do fármaco em pH ácido do estômago ou interações com os alimentos (SCHOELLHAMMER *et al.*, 2014). Além disso, essa via de administração também oferece vantagens sobre as injeções hipodérmicas e subcutâneas, as quais são invasivas, dolorosas e geram resíduos perigosos com o risco de transmissão de doenças pela reutilização de agulhas (MILLER e PISANI, 1999).

No entanto, a pele apresenta eficientes propriedades de barreira que tornam a entrega de fármacos um desafio, visto que o fármaco precisa difundir através de várias camadas com propriedades físico-químicas distintas.

O fármaco liberado a partir da formulação precisa difundir-se através do estrato córneo, camada mais lipofílica e resistente a entrada de substâncias na pele. Após atravessar essa camada, o fármaco precisa migrar para a camada mais inferior da epiderme viável, a qual possui características mais hidrofílicas (DANIELS, 2004). Em seguida o fármaco deve permear os capilares da derme e atingir a circulação sistêmica, caso o efeito desejado seja transdérmico.

2.2.1. Vias de difusão de moléculas através da pele

O fármaco pode atravessar as camadas da pele através de diferentes vias, como as vias transepidérmicas (intra e intercelular), as glândulas sudoríparas e os folículos capilares, como ilustrado pela Figura 2 (WILLIAMS, 2003; BARRY, 2001).

2.2.1.1. Via transepidérmicas

Existem dois possíveis caminhos por essa via, um é pela rota intracelular na qual as moléculas passam através das células e o outro caminho é o intercelular aquele em que as moléculas migram entre as células.

Assim, a via intracelular, também conhecida como transcelular, é o caminho mais direto, no qual as moléculas são capazes de atravessar um caminho formado por lipídios, membranas de corneócitos e citoplasma hidrofílico, alternativamente disposto (BARRY,

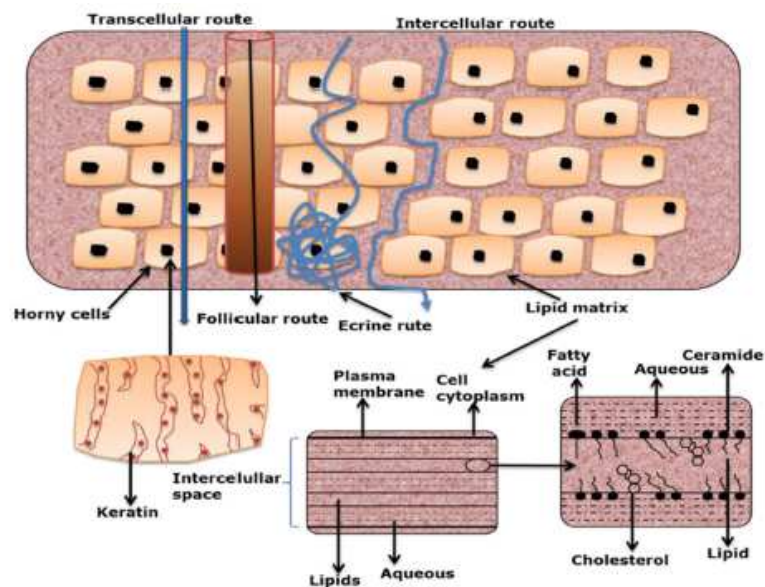
2001).). Por outro lado, na via intercelular as moléculas se difundem de forma passiva entre os corneócitos. A solubilidade tanto em fase lipídica quanto em aquosa é importante para moléculas que atravessam os corneócitos e pela via intercelular (GUY e HADGRAFT, 1989).

2.2.1.2. Vias de derivação

Os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas também oferecem caminhos pelos quais as moléculas podem cruzar o estrato córneo. Os fármacos que geralmente utilizam essa rota apresentam altas massas moleculares o que dificulta a migração dessas moléculas através das camadas da pele (WILLIAMS, 2003).

O papel dessas vias é muitas vezes negligenciado porque elas ocupam cerca de 0,1% da área total da superfície da pele. Entretanto, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a influência significativa desses anexos na penetração de várias moléculas através da pele (LADEMANN et al., 2006).

Figura 2. Possíveis vias de permeação de fármaco.



Fonte:ESCOBAR-CHÁVEZ et al. (2012)

2.2.2. Métodos ativos e passivos de administração cutânea

2.2.2.1. Passivos

Os meios convencionais de administração cutânea de fármacos incluem veículos como pomadas, cremes, géis, os quais são considerados uma tecnologia “passiva”. Nos últimos anos, essas formas farmacêuticas foram desenvolvidas e/ou modificadas para aumentar a

força motriz da difusão do fármaco (atividade termodinâmica) e/ou aumentar a sua permeabilidade na pele (BROWN et al., 2008).

Essas abordagens englobam o uso de promotores de penetração cutânea (BARRY, 2001), sistemas supersaturados (IBRAHIM, 2015), pró-fármacos (SLOAN *et al.*, 2011), lipossomas (BENSON, 2017), nanopartículas (PALMER; DELOUISE, 2016), hidrogéis (NASTRUZZI et al., 2013), cristais líquidos (VICTORELLI *et al.*, 2018) entre outros sistemas de liberação de fármacos. No entanto, uma desvantagem desse método é a quantidade limitada de fármaco administrado, já que propriedades de barreira da pele não são significativamente alteradas (BROWN et al., 2008).

2.2.2.2. Ativos

Os métodos passivos de entrega na pele são incapazes de garantir a permeação de moléculas muito grandes, o que levou a busca de estratégias alternativas usando dispositivos para entrega ativa de fármacos. Esses dispositivos são de natureza minimamente invasiva e são capazes de melhorar a permeação cutânea de moléculas, tendo como alvo a via de derivação (folículos pilosos e glândulas sudoríparas) e gerando novas vias de transporte transitórias de dimensões micrométricas através da pele. Alguns desses métodos incluem o emprego de energia externa para atuar como uma força motriz ou agir para reduzir a natureza da barreira do estrato córneo (BROWN et al., 2008).

Neste contexto, tais métodos "ativos" correspondem à aplicação e uso de iontoforese, sonoforese, laser, ablação térmica, eletroporação, radiofrequência, ultra-som, jatos de alta pressão e tecnologia de microagulhas. A sonoforese consiste na aplicação de ondas de alta ou baixa frequência de ultrassom para formar poros na pele temporariamente sem causar uma perturbação permanente no tecido cutâneo (LOMBRY *et al.*, 2000). As moléculas se difundem melhor entre esses poros e, assim, os fluxos atingidos são muito maiores (VANBEVER *et al.*, 1998).

O método físico de iontoforese envolve a aplicação de um baixo potencial elétrico sobre a pele capaz de gerar uma corrente elétrica. A mobilidade iontoforética é alta para moléculas grandes, agregados ou compostos altamente hidrofílicos, portanto esse método limita-se às propriedades físico-químicas das moléculas utilizadas. O potencial de hidrogênio da molécula também é uma propriedade a ser considerada para esse método (KALIA et al., 2004).

Essas técnicas têm sido importantes para atingir concentrações plasmáticas terapêuticas de fármacos hidrofílicos e macromoléculas, além de aumentar a eficácia de vacinas, reduzindo a dose. Porém, o custo, a segurança e o acesso dos pacientes continuam sendo preocupações (DONNELLY, 2017).

2.3. Doenças cutâneas

2.3.1. Psoríase

A psoríase é outra doença inflamatória cutânea que afeta cerca de 2 a 3% da população mundial, sendo caracterizada por hiperproliferação dos queratinócitos e formação de um foco inflamatório (NICKOLOFF et al., 2004).

O processo inflamatório na psoríase envolve uma interação complexa entre respostas imunes inatas e adquiridas, com a participação de citocinas de células T, queratinócitos, células dendríticas, neutrófilos, monócitos e macrófagos, bem como alterações no equilíbrio entre fatores pró e anti-apoptóticos. Neste contexto, as manifestações clínicas clássicas da doença surgem como placas escamosas e eritematosas, demonstrando hiperqueratose e infiltrado inflamatório (GOLDMINZ *et al.*, 2013).

O distúrbio cutâneo na psoríase atinge os queratinócitos, tanto nas respostas imunes inatas quanto nas adquiridas, principalmente nos processos associados com células T. O fator nuclear - kappa B (NF-kB) é um mediador na patogênese da psoríase, uma vez que liga os estados dos queratinócitos e células imunes alteradas através de seus efeitos sobre a proliferação celular, diferenciação, apoptose e a produção de citocinas e quimiocinas (TSURUTA, 2009).

Diversos sinais apoptóticos são mantidos dentro dos queratinócitos epidérmicos, resultando em taxas desreguladas de morte celular programada e um ciclo celular epidérmico quase nove vezes maior que a pele normal (WEINSTEIN *et al.*, 1985). A sinalização desregulada de NF-kB pode alterar os sinais apoptóticos celulares (GOSH, 2012).

2.3.2. Dermatite atópica

A dermatite atópica (DA) é um distúrbio cutâneo crônico e recidivante com alergia e inflamação que está associado ao estado de hiper-reatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos (LEUNG et al., 2004). Em 80% dos casos, esta doença inicia-se antes dos 5 anos de idade e pode persistir até a fase adulta, sendo

caracterizada por lesões avermelhadas, prurido intenso, ressecamento (xerose), níveis elevados de IgE e eosinofilia (GUTTMAN-YASSKY et al., 2007).

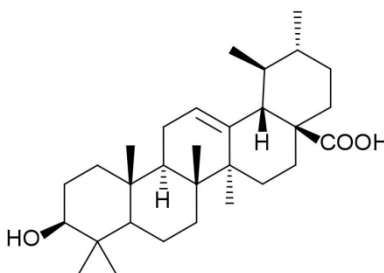
A hipersensibilidade e disfunção da barreira da pele atópica desempenham um papel crítico na exacerbação das manifestações clínicas (LEUNG et al., 2004), sendo a coceira um dos mais graves sintomas clínicos da DA, a qual é induzida pela extensão local de fibras nervosas sensoriais, inflamação neurogênica e liberação de mediadores químicos a partir dos mastócitos (BELTRANI, 2005; BOGUNIEWICZ, 2005).

As lesões cutâneas presentes na DA causam expressão local de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esses mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 α e IL-1 β de células residentes e ativação de Toll-like receptores em resposta à agressões ou infecção ativam o fator de transcrição gênica NF-kB, que regula a ativação e produção de citocinas e outros mediadores da inflamação envolvido com a patogênese de doenças inflamatórias (KUPPER, 1990; BARNES, 1996; MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Ainda, as lesões de DA, receptores de IgE são regulados em células de Langerhans e após a ligação liberam TNF- α e monócitos proteína quimiotática-1 (MCP-1), os quais podem ser bloqueados por inibidores de NF-kB (KRAFT *et al.*, 2002; NOVAK *et al.*, 2004). Portanto o NF-kB desempenha um papel importante na patogênese da DA.

2.4. Ácido ursólico

O ácido ursólico é um triterpenoide pentacíclico (C₃₀H₄₈O₃, Figura 3) de massa molecular correspondente a 456,68 g/mol e ponto de fusão de 283-285 °C, que pertence à classe de compostos isoprenóides (C₃₀). Estes compostos são amplamente distribuídos na natureza; portanto, o AU pode ser isolado a partir de várias plantas, como *Calluna vulgaris* (urze), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Callendula officinalis* (calêndula), *Melaleuca leucadendron* (melaleuca), *Malus domestica* (maçã), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* (sálvia), *Origanum majorana* (manjerona), *Lavandula angustifolia* (flores de lavanda), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Eucalyptus* (eucalipto) entre outras (WOZNIAK et al., 2015; LIU, 2005; MOREAU et al., 2002).

Figura 3. Estrutura química do ácido ursólico

Fonte: IKEDA et al. (2008).

Esse composto sólido cristalino, quimicamente conhecido como ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico, tem sido usado por muito tempo na medicina popular por suas atividades terapêuticas (WOZNIAK *et al.*, 2015). Recentemente, a busca por substâncias biologicamente ativas de fontes naturais aumentou o interesse em sua investigação.

Diversos estudos indicam que o AU tem vários efeitos farmacológicos, incluindo anti-inflamatório (CHECKER *et al.*, 2012), hepatoprotetor (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO *et al.*, 2016), antitumoral (LEWINSKA *et al.*, 2017), cardioprotetor (DONG *et al.*, 2015), neuroprotetor (LI *et al.*, 2013), antimicrobiano (NASCIMENTO *et al.*, 2014), anti-hiperlipidêmico (WANG *et al.*, 2013), antidiabético (WANG *et al.*, 2012) e tripanocida (DA SILVA *et al.*, 2010).

A atividade anti-inflamatória do AU têm sido investigada desde a década de 1990, sendo que um dos primeiros relatos do efeito anti-inflamatório do AU em macrófagos foi publicado por Najid *et al.* (1992), que verificaram potencial inibidor do metabolismo de araquidonato pelo AU isolado a partir de *Calluna vulgaris*.

Estudos posteriores revelaram que o pré-tratamento com AU resultou em uma diminuição da expressão de enzimas de iNOS e COX-2 via inibição do NF- κ B em células RAW264.7 (linhagem celular de monócitos e macrófagos de ratos) (RYU *et al.*, 2000; SUH *et al.*, 1998;). Subbaramaiah *et al.* (2000) constataram que o AU suprimiu a expressão de COX-2 e a síntese de prostaglandinas E-2 em células epiteliais mamárias. Além disso, o AU também exibiu atividade anti-inflamatória significativa em edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos (MICELI *et al.*, 2005).

De acordo com os estudos apresentados, o mecanismo envolvido na atividade anti-inflamatória do AU têm sido atribuído à inibição ou redução de diferentes mediadores inflamatórios, tais como a liberação de histamina, a secreção de citocinas (IL-1 β e TNF- α), a

atividade da 5 lipoxigenase, da elastase e a síntese de NO e PGE2 principalmente via inibição do NF- κ B (LIU, 1995; CHECKER *et al.*, 2012).

No entanto, apesar da potente atividade anti-inflamatória e outros diversos efeitos farmacológicos do AU, a sua baixa solubilidade em meio aquoso ($1,02 \times 10^{-4}$ mg/L a 25°C) é um fator limitante para sua aplicação terapêutica, visto que a solubilidade e polaridade de um fármaco pode influenciar a sua capacidade de permear membranas biológicas (LIU, 2005; US EPA, 2009; SHAZLY *et al.*, 2012)

Assim, novas abordagens foram introduzidas para melhorar as propriedades biofarmacêuticas deste composto, particularmente utilizando as tecnologias de sistemas de liberação de fármacos. Vários sistemas de liberação de AU têm sido utilizados com sucesso, como nanoemulsões (VARGAS *et al.*, 2003), nanopartículas de sílica mesoporosa (LI *et al.*, 2016), nanopartículas lipídicas sólidas (NAHAK *et al.*, 2016), lipossomas (LOPES, 2013) géis niosomais (JAMAL *et al.*, 2015) e dispersões sólidas (ELOY; MARCHETTI, 2014).

2.5. Dispersões sólidas

Nos últimos anos, com o aumento do número de novos produtos aprovados pela FDA, a dispersão sólida está firmemente estabelecida como uma tecnologia de plataforma para a entrega de substâncias pouco solúveis em água. Particularmente, essa tecnologia de dispersão sólida tem sido aplicada com sucesso no desenvolvimento de formulações com alta concentração de fármaco e/ou contendo substâncias com alta tendência a cristalizar (HUANG *et al.*, 2014).

As dispersões sólidas (DS) podem ser definidas como sistemas em que o fármaco encontra-se disperso molecularmente ou no seu estado amorfo em uma matriz sólida biologicamente inerte (SETHIA *et al.*, 2003).

Com base na distribuição das moléculas do fármaco na matriz transportadora, as DS podem ser divididas em 3 tipos: (1) misturas eutéticas, que são misturas de dois compostos numa proporção específica e possuem um único ponto de fusão que é mais baixo do que o ponto de fusão de cada composto individual; (2) soluções sólidas que são subdivididas em soluções sólidas substitucionais (a molécula de soluto substitui uma molécula de solvente), soluções sólidas intersticiais (a molécula de soluto está presente nos interstícios) e soluções sólidas amorfas com soluto distribuído aleatoriamente em veículos amorfos; (3) dispersões cristalinas microfinas, que são dispersões cristalinas de fármacos na matriz polimérica (VO *et al.*, 2013; CHIOU; RIEGELMAN, 1971).

O aumento da solubilidade de fármacos em DS pode ser atribuído a diversos fatores, como a redução do tamanho das partículas, a aglomeração reduzida, melhor molhabilidade, e principalmente à conversão de um fármaco no estado cristalino para o amorfo, o qual não requer energia para quebrar a rede cristalina (CRAIG, 2002). A incorporação de fármacos em DS é considerada uma das melhores estratégias do ponto de vista financeiro para a indústria farmacêutica, pois se trata de um processo simples, rápido e aplicável (SERAJUDDIN, 1999).

Ainda que outros aditivos (especificamente tensoativos) sejam incluídos e produtos possam ser obtidos a partir de misturas de polímeros, as dispersões sólidas são principalmente sistemas formados por dois componentes, fármaco e polímero, no qual o fármaco e o polímero atuam como soluto e solvente, respectivamente. Embora esses sistemas demonstrem serem aparentemente simples, podem formar múltiplas estruturas, dependendo de sua composição e histórico de processamento (LIN; HUANG, 2010).

Quando a quantidade de fármaco presente nas DS é menor do que a solubilidade de equilíbrio (quando sólido se dissolve dando origem a seus íons em solução) do mesmo no polímero, o fármaco é disperso molecularmente dentro da matriz sólida e pode formar uma solução homogênea termodinamicamente estável, cuja estrutura é a mais desejável para DS (HUANG;DAI, 2014). Porém, na maioria dos casos, esta situação só ocorre com uma carga muito baixa de fármaco e/ou sob alta temperatura. Com a diminuição da temperatura, a mistura pode tornar-se uma solução supersaturada e o soluto tende precipitar, resultando em uma dispersão de partículas cristalinas na matriz, na qual a concentração de fármaco corresponde a sua solubilidade de equilíbrio a essa temperatura (CHENG, 2008).

Como a cristalização de um fármaco consiste em um processo lento que apresenta uma barreira energética maior comparada à separação da fase amorfa, pode obter-se uma estrutura meta-estável intermediária, na qual agregados de moléculas amorfas encontram-se dispersas em uma matriz polimérica, assim o fármaco estará na sua solubilidade amorfa a essa temperatura (KONINGSVELD et al, 2001).

2.5.1. Métodos de obtenção de dispersão sólida

Os dois principais métodos utilizados para obtenção de DS são o de fusão e o de evaporação do solvente (SETHIA et al., 2003). No método de fusão, o fármaco e o carreador são misturados e fundidos, seguidos por resfriamento e pulverização do produto em partículas menores (ELOY et al., 2014). Para utilizar esse método é necessário que ambos sejam miscíveis na forma fundida e apresentem alta termoestabilidade (LEUNER et al., 2000).

Embora esse método seja muito empregado, existem algumas limitações na preparação de DS a partir do método de fusão, como a falta de miscibilidade do fármaco no polímero à temperatura de aquecimento. Além disso, a mistura fundida deve permanecer estável contra recristalização e separação de fases durante a vida de prateleira dos produtos (GHEBREMESKEL *et al.*, 2006).

O método de extrusão por fusão a quente é a versão mais moderna do método de fusão em que a mistura dos componentes é realizada por uma extrusora. A extrusão por fusão oferece a habilidade de moldar a mistura de fármaco-polímero em implantes, pastilhas ou formas farmacêuticas orais (PATIL *et al.*, 2015).

Essa técnica possui vantagens, como (1) ausência de solvente; (2) menos etapas de processamento, visto que não há necessidade de compressão de ingredientes e secagem de produtos, o que torna o processo mais simples e eficiente; e (3) mistura completa em alta taxa de cisalhamento e temperatura permite uma distribuição uniforme de partículas de fármaco na matriz polimérica (REPKA *et al.*, 2007). Em comparação com o método tradicional de fusão, essa técnica possibilita a fabricação contínua, o que a torna viável para a produção em grande escala (SHARMA; JAIN, 2011).

No método de evaporação do solvente, fármaco e carreador são dispersos ou solubilizados em um único solvente orgânico, o qual em seguida é removido por evaporação para produzir uma dispersão sólida (DHIRENDRA *et al.*, 2009). Diversas técnicas podem ser empregadas para evaporação do solvente, como a secagem a vácuo, roto-evaporação, spray-drying entre outras (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Esse método geralmente permite a mistura em nível molecular, que é preferida para aumentar a solubilidade e a estabilidade do produto.

O método de evaporação do solvente evita a decomposição térmica do fármaco e do polímero, uma vez que não exige altas temperaturas para evaporação de solventes orgânicos. Entretanto, a solubilização do fármaco e o polímero em um único solvente pode ser difícil se ambos apresentarem diferenças significativas de polaridade. Os tensoativos podem ser usados para melhorar a solubilidade do fármaco ou do polímero em determinados solventes (BAGHEL *et al.*, 2016).

Além disso, a necessidade de evaporar uma grande quantidade do solvente torna o processo caro. A secagem rápida pode ser obtida por um evaporador rotativo, temperaturas de secagem mais elevadas são preferidas, pois reduz o tempo disponível para a separação de

fases. Porém, a alta mobilidade molecular de fármacos e polímeros em temperaturas elevadas pode acelerar a separação de fases (SERAJUDDIN, 1999).

2.5.2. Carreadores

A escolha do carreador tem um grande impacto no sucesso da estratégia de dispersão sólida. A Tabela 1 resume alguns polímeros que têm sido empregados em formulações comerciais de dispersões sólidas.

Tabela 1. Exemplos de dispersões sólidas disponíveis no mercado (JANSSENS *et al.*, 2009).

Nome Comercial	Fármaco	Carreador
Gris-PEG	griseofulvina	PEG6000
Cesamet	nabilone	PVP
Lopinavir	ritonavir	PVPVA
Sporanox	itraconazol	HPMC
Intelence	Etravirin	HPMC
Certican	Everolimus	HPMC
Isoptin SR-E	Verapamil	HPC/HPMC
Nivadil	Nivaldipina	HPMC
Prograf	Tacrolimus	HPMC
Rezulin	Troglitazona	PVP

HPMC, hidroxipropilmetilcelulose; HPC, hidroxipropilcelulose; PEG, polietilenoglicol; PVP, polivinilpirrolidona; PVPVA, polivinilpirrolidona-co-vinilacetato.

A presença de grupos funcionais que são doadores ou receptores de ligações de hidrogênio é vantajosa, visto que interações específicas aumentam a solubilidade do fármaco em seu veículo e também desempenham um papel importante na inibição da separação de fases e cristalização de um fármaco (MARSAC *et al.*, 2006).

O carreador de escolha deve ser inerte e reconhecido como biologicamente seguro. Além disso, a estabilidade térmica e a termoplaticidade são características benéficas para sistemas obtidos por extrusão, enquanto a solubilidade em solventes orgânicos é um pré-requisito para carreadores selecionados para produzir DS por meio do método de evaporação do solvente (MATSUMOTO; ZOGRAFI, 1999).

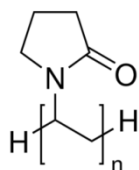
A primeira geração de DS envolveu a utilização de veículos cristalinos altamente hidrofílicos e termodinamicamente estáveis e resultou na melhora da solubilidade e dissolução de fármacos. Na segunda geração de DS, os carreadores cristalinos foram substituídos por materiais amorfos, geralmente constituídos por polímeros hidrofílicos, permitindo uma liberação mais rápida do fármaco em relação à geração anterior. Já terceira e mais recente geração de DS está associada com o emprego de agentes tensoativos ou a mistura destes com polímeros amorfos com a finalidade de obter uma melhora mais acentuada do perfil de dissolução de fármacos com limitada solubilidade em meio aquoso, além de estabilizar os sistemas por evitar a recristalização do fármaco (VASCONCELOS et al., 2007).

2.5.2.1. Polivinilpirrolidona

A polivinilpirrolidona (PVP), também conhecida como povidona (Figura 4) é um importantepolímero sintético, obtido por polimerização via radicalar em água ou em álcool isopropílico, com característica higroscópica e compatível com resinas hidrofílicas e hidrofóbicas (HAAF *et al.*, 1995).

O PVP é um polímero hidrofílico com alta solubilidade em água, bem como em vários solventes orgânicos como butanol, clorofórmio e diclorometano. A sua solubilidade aquosa é atribuída à presença do grupo polar lactama (lactona + amida), enquanto que os grupos metileno não polares possuem uma propriedade mais lipofílica (BUHLER, 2005).

Figura 4. Estrutura química da polivinilpirrolidona (PVP)



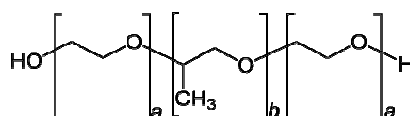
A elevada solubilidade do PVP na maioria dos solventes convencionais impulsionou a sua utilização na produção farmacêutica em várias formas farmacêuticas, por exemplo, na granulação úmida na produção de comprimidos, em soluções orais, xaropes e gotas, em soluções injetáveis e tópicas e em revestimentos de filmes em comprimidos (FLORENCE; ATTWOOD, 2006). Além disso, a PVP tem sido usada extensivamente em aplicações biomédicas, já que o grupo lactama na pirrolidona torna sua característica estrutural muito semelhante à de proteínas (RAVIN *et al.*, 1952).

O PVP, em função da sua estrutura química, possui a capacidade de formar complexos com várias substâncias de baixo peso molecular, assim como diversos polímeros. Essa habilidade de formar complexos é uma característica desejável, pois substâncias insolúveis podem ser solubilizadas (WILLIAMS, 2008). Dessa forma, o PVP, mais especificamente a polivinilpirrolidona K-30 (C₆H₉NO)_n de massa molecular ~40.000 g/mol têm sido empregada com sucesso como veículo em dispersões sólidas de diferentes fármacos (ALVES *et al.*, 2014; SETHIA; SQUILLANTE, 2004).

2.5.2.2. Poloxamer

O copolímero em bloco de poloxâmero consiste em blocos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) dispostos em uma estrutura tribloco (Figura 5). Esses polímeros são sintetizados por polimerização sequencial de monômeros PO e EO na presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (KABANOV *et al.*, 2002). A purificação dos copolímeros em bloco pode ser realizada por fracionamento cromatográfico.

Figura 5. Estrutura química do poloxamer, (a) monômeros de oxietileno e (b) monômeros de oxipropileno.



Os poloxâmeros apresentam características anfifílicas determinadas por seus valores de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), que varia de acordo como número de monômeros (a) e (b). Assim, o tamanho, a propriedade lipofílica e/ou hidrofílica pode ser facilmente alterada por meio da variação destes parâmetros (DUMORTIER *et al.*, 2006).

O poloxamer 407, conhecido pelo nome comercial de Pluronic F-127 (laboratórios da BASF, Wyandotte, EUA) apresenta massa molecular em torno de 12.600 g/mol (TAKATS *et al.*, 2001) e o número dos monômeros (a) e (b) são iguais a 95-105 e 54-60, respectivamente, com valor de EHL igual a 22 a temperatura de 22°C (KABANOV *et al.*, 2002; MOGHIMI; HUNTER, 2000). Além disso, esse composto foi considerado seguro e inerte pelo guia FDA para a obtenção de diferentes produtos farmacêuticos, como solução oral, suspensão, formulações oftálmicas ou tópicas (ROWE *et al.*, 2005).

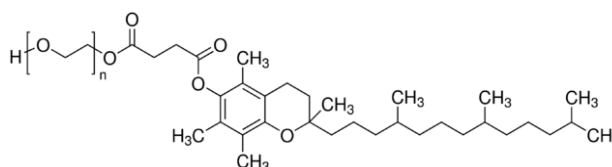
O poloxamer 407, devido às suas propriedades anfifílicas é extremamente conhecido por sua habilidade desolubilizar diferentes compostos hidrofóbicos (KABANOV *et al.*, 2002).

Dessa forma, este copolímero tem sido muito utilizado como carreador de diferentes fármacos em dispersões sólidas (DUGAR *et al.*, 2016; ELOY; MARCHETTI, 2014).

2.5.2.3. D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS)

O TPGS é um derivado solúvel da vitamina E, obtido por esterificação de succinato de vitamina E com polietilenoglicol, possui uma estrutura anfifílica com cauda lipofílica e a cabeça polar hidrofílica (Figura 6). Apresenta uma concentração crítica micelar de 0,02% p/p e valor de HLB igual a 13,2 (WU; HOPJINS, 1999). A FDA dos EUA aprovou o TPGS como um adjuvante farmacêutico seguro para ser usado no desenvolvimento de medicamentos.

Figura 6. Estrutura química do D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS).



Esse derivado da vitamina E que tem sido amplamente utilizado como agente solubilizante, promotor de permeação (ISMAILOS *et al.*, 1994), agente bioadesivo (REPKA *et al.*, 2000) e como veículo em formulações farmacêuticas (AGGARWAL *et al.*, 2012; WU; HOPJINS, 1999), além de ter sido empregado com sucesso como carreador em dispersões sólidas de fenofibrato (BHISE, 2011), carbamazepina (SETHIA *et al.*, 2004) e itraconazol (EERDENBRUGH *et al.*, 2009).

2.6. Hidrogéis

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais formadas por macromoléculas interligadas por meio de interações físicas ou ligações covalentes, que garantem uma estrutura em rede e estabilidade física (PEPPAS, 1986). Entre as principais características desses sistemas estão a sua habilidade de absorver grande quantidade de líquidos sem se dissolver, biocompatibilidade, natureza elástica semelhante aos tecidos, alta porosidade, capacidade de incorporação e liberação controlada de fármacos (HOFFMAN, 2002).

Hidrogéis que são obtidos por meio de ligações cruzadas físicas incluem emaranhamentos, cristalitos, interação de Van der Waals ou pontes de hidrogênio (SHAPIRO, 2011). Enquanto que os hidrogéis conhecidos como "químicos" são formados por redes reticuladas ligadas covalentemente (OTTO, 1960; ALLAN, 2012).

Os hidrogéis revelam-se como um excelente carreador para a entrega tópica de fármacos. Essa formulação semi-sólida exhibe propriedades tanto rígidas quanto elásticas, com diversas aplicações em cosméticos, medicamentos, biomateriais e tecnologias de alimento (ALLAN, 2012; OTTO, 1960).

De maneira geral, os géis comparados aos cremes e pomadas, permitem uma melhor dissolução dos fármacos e facilitam a migração do mesmo através da matriz em função do seu alto teor de água. Além disso, confere alto poder hidratante à pele, possibilitando a retenção de uma quantidade significativa de água transepidérmica que facilita o transporte de fármacos (CHANG et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na liberação do fármaco a partir dos hidrogéis podem ocorrer por difusão e estimulação química. A difusão é controlada pelo movimento através da matriz polimérica ou pela erosão a granel do hidrogel. Os géis responsivos a estímulos externos, como pH, temperatura ou ação enzimática formam poros para liberar o fármaco aprisionado (MOHD *et al.*, 2012). Esse mecanismo é muito empregado na liberação direcionada de fármacos para tecidos afetados. O mecanismo de difusão é o mais comum na liberação local e não específica de fármacos (PEPPAS et al., 2000).

3. OBJETIVO

Desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito biológico *in vitro* e *in vivo* de dispersões sólidas de ácido ursólico constituídas por polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) e poloxamer 407 (P407) ou D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) veiculadas em hidrogéis para administração cutânea.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver dispersões sólidas de ácido ursólico constituídas de P407 ou TPGS a partir do delineamento de um planejamento fatorial 2⁴;
- Caracterização físico-química das DS por calorimetria exploratória diferencial, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura;
- Estudo de estabilidade físico-química das dispersões sólidas selecionadas;
- Validar métodos analíticos para quantificação do ácido ursólico;
- Desenvolver hidrogéis de poloxamer 407, incorporar as dispersões sólidas selecionadas nos hidrogéis e caracterizá-los por análise do perfil de textura, reologia e teste de bioadesão *in vitro*;
- Estudo de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do fármaco e das formulações desenvolvidas;
- Investigar a citotoxicidade *in vitro* das formulações finais;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* das formulações selecionadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Principais reagentes e matérias-primas

- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker®, USA);
- Ácido acético (Synth®, Brasil);
- Ácido ursólico (Idealfarma, Brasil)
- Água MiliQ (Millipore);
- Diclorometano (J.T. Baker®, USA)
- D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (Sigma Aldrich®, USA);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth®, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Synth®, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio (Synth®, Brasil)

- Polivinilpirrolidona K-30 (Synth®, Brasil)
- Poloxamer 407 (Sigma Aldrich®, USA);

Principais equipamentos

- Agitador de tubos (Phoenix® AP22);
- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a);
- Analisador de textura TA-XT plus® (Stable Micro Systems®, UK);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Calorímetro Exploratório Diferencial (Mettler Toledo®);
- Coluna Luna C18 250 mm x 4.6mm, 5µm (Phenomenex, EUA);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Perkin Elmer, Brasil);
- Dermatômetro (Nouvag TCM 300);
- Difratômetro de raio X (Rigaku Rint 2000, Japão);
- Estereoscópio Leica MZ APOTM;
- Estufa modelo 702.780 (Quimis®, Brasil);
- Incubadora Shaker orbital MA 420 (Marconi®, Brasil);
- Reômetro, modelo RS-1 – Haake Rheostress
- Rotaevaporador RV digital (IKA®, Alemanha);
- Sistema automático com células de difusão vertical de Franz (Microette Plus – Hanson Research Corporation®);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli - Q Plus, condutividade 18,2µS.cm-1;
- Spectrafuge™ 16 M Microcentrífuga (Labnet®, USA);
- Ultraturrax Digital T25 - Ika®.

4.2. Métodos

4.2.1. Co-validação de método analítico para análise quantitativa de ácido ursólico em dispersões sólidas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A co-validação foi realizada utilizando um método previamente desenvolvido e validado por Eloy e colaboradores(2012). Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão, exatidão e robustez conforme as

especificações da RDC N°166 da ANVISA (BRASIL, 2017) e diretrizes do guia *Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005).

As análises foram realizadas em temperatura ambiente controlada ($25,0 \pm 1,0$ °C) utilizando uma vazão de 0,950 mL/min e volume de injeção de 20 µL em cromatógrafo Perkin Elmer, constituído por duas bombas (sistema binário), detector UV-Vis ($\lambda = 203$ nm) e injetor manual, utilizando fase móvel constituída de acetonitrila : água (88:12, v/v) e coluna RF-C18 Luna® Phenomenex (250 x d.i. 4,6 mm; 5 µm). As amostras foram diluídas em acetonitrila e filtradas em membrana PTFE 0,45 µm antes do início das análises.

4.2.1.1. Conformidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada a partir da injeção de 6 replicatas na concentração de 25 µg/mL de ácido ursólco por meio dos cálculos da média e desvio padrão relativo dos seguintes parâmetros: tempo de retenção e área do pico do fármaco, assimetria do pico, fator de cauda (T) e número de pratos da coluna (N).

4.2.1.2. Seletividade

Para demonstrar que os constituintes da formulação não interferem nas análises quantitativas do AU, a seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos pelas análises do fármaco livre, componentes da fase móvel e das dispersões sólidas sem o fármaco.

4.2.1.3. Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela média da construção de três curvas analíticas do ácido ursólico. A partir da solução estoque de AU (250 µg/mL) foram preparadas soluções padrões em concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL usando acetonitrila como solvente, a leitura das amostras foi realizada em triplicata (n=3). Os resultados de linearidade foram avaliados por meio de análise de variância ANOVA a nível de $\alpha = 0,05$ (95% do intervalo de confiança).

4.2.1.4. Limite de detecção

A menor quantidade de AU que pode ser detectada foi determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a equação 1, em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão.

$$LD=(3,3 \times \sigma)/IC \text{ (Equação 1)}$$

4.2.1.5. Limite de quantificação

A menor quantidade de AU que pode ser quantificada com precisão e exatidão foi determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a equação 2, em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão.

$$LQ=(10 \times \sigma)/IC \text{ (Equação 2)}$$

4.2.1.6. Precisão

A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. Esses parâmetros foram analisados em seis réplicas a 100% da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ individualmente preparadas. Para determinação da repetibilidade as análises foram realizadas em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesma instrumentação e condições experimentais.

Para avaliar a precisão intermediária os ensaios foram realizados em dois dias diferentes com dois analistas diferentes. A proximidade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a equação 3, na qual DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

$$DPR=(DP/CMD) \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

4.2.1.7. Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio da contaminação das formulações sem o fármaco com três concentrações conhecidas do AU baixa (2,5 $\mu\text{g/mL}$), média (25 $\mu\text{g/mL}$) e alta (50 $\mu\text{g/mL}$). A partir de uma solução estoque de AU (250 $\mu\text{g/mL}$) e de uma solução estoque de dispersões sólidas sem o fármaco na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram analisadas em triplicata em um mesmo dia. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado por meio do cálculo de recuperação (equação 4):

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \text{ (Equação 4)}$$

4.2.1.8. Robustez

A robustez de um método indica a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações nas condições analíticas estabelecidas (INMETRO, 2003). Neste estudo, as análises foram realizadas utilizando a concentração de 25µg/mL em acetonitrila e a robustez foi avaliada por meio de pequenas alterações na proporção dos componentes da fase móvel acetonitrila: água (86,8:13,2); (88:12) e (89,2:10,8) e sua vazão de 0,900; 0,950 e 1 mL/min .

4.2.2. Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas de AU.

A existência de poucas informações sobre os parâmetros para o desenvolvimento de dispersões sólidas por meio do método de evaporação do solvente, utilizando a técnica de rotoevaporação pode resultar em dificuldades e atraso no processo de produção. Com base em um levantamento bibliográfico das metodologias utilizadas para obtenção de DS a partir da técnica de rotoevaporação, foi construído um planejamento fatorial completo (2^4).

O objetivo do planejamento foi avaliar se fatores como a proporção (p/p) de fármaco: polímero: tensoativo (F:P:T), volume de solvente (V, mL) utilizado para solubilizar o fármaco e os carreadores, número de rotações por minuto (rpm) e tipo de tensoativo poderiam influenciar nas respostas de solubilidade do AU em água, diâmetro médio das partículas ou no teor (%) de fármaco presente nas DS. Desse modo, foi realizado um planejamento fatorial completo com dois níveis na forma codificada -1 (nível baixo) e +1 (nível alto) e quatro variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3 e X_4), resultando em um total de 16 experimentos, como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2.Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas de AU.

Experimento	Valores codificados				Valores reais			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	F:P:T	V (mL)	(rpm)	Tensoativo
1	-1	-1	-1	-1	0,5:7,5:2	20	50	P407
2	1	-1	-1	-1	1:6:3	20	50	P407
3	-1	1	-1	-1	0,5:7,5:2	30	50	P407
4	1	1	-1	-1	1:6:3	30	50	P407
5	-1	-1	1	-1	0,5:7,5:2	20	100	P407
6	1	-1	1	-1	1:6:3	20	100	P407
7	-1	1	1	-1	0,5:7,5:2	30	100	P407
8	1	1	1	-1	1:6:3	30	100	P407
9	-1	-1	-1	1	0,5:7,5:2	20	50	TPGS
10	1	-1	-1	1	1:6:3	20	50	TPGS
11	-1	1	-1	1	0,5:7,5:2	30	50	TPGS
12	1	1	-1	1	1:6:3	30	50	TPGS
13	-1	-1	1	1	0,5:7,5:2	20	100	TPGS
14	1	-1	1	1	1:6:3	20	100	TPGS
15	-1	1	1	1	0,5:7,5:2	30	100	TPGS
16	1	1	1	1	1:6:3	30	100	TPGS

***F:P:T:** proporção (p/p) de fármaco:polímero:tensoativo; **Vol. mL:** volume de solvente; **rpm:** número de rotações por minuto no rotoevaporador.

4.2.2.1. Preparo das dispersões sólidas nas condições selecionadas com base no planejamento fatorial

As dispersões sólidas de AU foram obtidas nas concentrações de 5 e 10 % (p/p) de AU utilizando o polímero PVP K-30 nas concentrações de 75 e 60%(p/p) e os tensoativos TPGS ou P407 nas concentrações de 20 e 30%(p/p). O preparo das DS foi realizado pelo método de evaporação do solvente, usando diclorometano como solvente. O fármaco e os carreadores foram solubilizados em diclorometano sob agitação magnética (200 rpm) por 30 minutos. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo à temperatura controlada (30°C), sob pressão reduzida (-300 mmHg). Posteriormente, as DS obtidas foram mantidas, em estufa com circulação de ar, por 24 horas para remover qualquer resíduo de solvente orgânico. Em seguida, foram pulverizadas usando gral e pistilo, calibradas em tamis com abertura de malha

80 mesh (180 μm) e armazenadas em dessecador em temperatura ambiente (WEGIEL *et al.*, 2012).

4.2.2.2. Preparo e obtenção das misturas físicas

As misturas físicas (MF) foram preparadas pela simples mistura do fármaco e carreadores pulverizados com o auxílio de gral e pestilo, calibradas em tamis com abertura de malha 80 mesh (180 μm) e armazenadas em dessecador à temperatura ambiente. As MF foram utilizadas como um controle das DS nos experimentos seguintes.

4.2.2.3. Determinação do teor de fármaco nas dispersões sólidas

Para determinar o conteúdo de ácido ursólico presente nas DS, uma quantidade de DS, que corresponde teoricamente a 0,5 mg do fármaco foi pesada e solubilizada em um volume conhecido de acetonitrila (2 mL). As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com acetonitrila (ELOY *et al.*, 2012). As amostras foram filtradas em membranas PTFE (0,45 μm) e então analisadas por CLAE.

4.2.2.4. Estudo de solubilidade do ácido ursólico nas dispersões sólidas.

A solubilidade do AU nas DS foi determinada com a adição de um excesso de fármaco em água em condições acima da saturação. As amostras foram submetidas à agitação por 48 horas em agitador orbital (incubadora Shaker MA-450) a 50 rpm e temperatura controlada de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (temperatura da pele) e foram filtradas em membrana PVDF (0,45 μm). Em seguida, as soluções resultantes foram diluídas em acetonitrila, filtradas e analisadas por CLAE a partir do método analítico validado (PARK *et al.*, 2000).

4.2.2.5. Análise do tamanho das partículas de dispersões sólidas

As análises do tamanho de partícula foram realizadas em estereoscópio Leica MZ APOTM, no qual as amostras foram dispostas sobre placas de Petri e as imagens captadas com o auxílio do programa *Motic Images Advance 2.0*, utilizando-se o aumento de 80x. A distribuição do tamanho das partículas foi avaliada a partir da determinação do diâmetro de Feret a 0° para 100 partículas de cada formulação, por meio da captura das imagens em computador utilizando o programa analisador de imagem *Motic Images Advance 3.2*. O cálculo da média e desvio padrão dos resultados obtidos foi realizado (BONI *et al.*, 2015).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise da morfologia de superfície do ácido ursólico livre, das dispersões sólidas com e sem fármacos, assim como da estrutura interna dos hidrogéis obtidos foi realizada com a utilização de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-7500F) operando em voltagem de a 25kV. As amostras foram fixadas em porta amostra sobre uma fita adesiva de carbono e revestidas com material condutor de elétrons (ouro). Os hidrogéis foram previamente liofilizados para a realização das análises de MEV.

4.2.4. Difração de raios-X (DRX)

As medidas de DRX foram executadas em difratômetro (Rigaku Rint 2000) à temperatura ambiente, sob radiação de Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), com potência de 40 kV e corrente elétrica de 50 mA. Os espectros das amostras foram obtidos com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 40° e velocidade do goniômetro de $2^\circ/\text{min}$ (ZHOU *et al.*, 2015).

4.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises foram realizadas em equipamento modelo DSC 1 Star System, (Mettler Toledo®), sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (50 mL/min). Os ensaios foram conduzidos com a transferência de cerca de 5mg das amostras para um cadinho de alumínio com tampa, utilizando um cadinho vazio como referência. As amostras foram aquecidas na faixa de 25 a 300 °C a uma razão de aquecimento de 10 °C/min.

4.2.6. Estabilidade físico-química das dispersões sólidas.

As dispersões sólidas foram mantidas em recipientes hermeticamente fechados e armazenados em câmara climática à temperatura controlada de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 0,5 \%$ de umidade relativa. A estabilidade física foi avaliada no período de 0, 30, 60 e 90 dias por análises de difração de raios-X e avaliação do conteúdo de fármaco nas DS (VERONEZ *et al.*, 2015).

4.2.7. Preparo e obtenção dos hidrogéis de poloxamer

Os hidrogéis de poloxamer na concentração de 25% (p/v) foram obtidos a partir do "método frio" descrito por Schmolka (SCHMOLKA, 1972). Uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) foi previamente preparada, e então o copolímero foi lentamente adicionado a esta solução de NaCl sob banho de gelo em agitação magnética constante (100rpm) por 30 minutos. As soluções foram armazenadas em geladeira a 4 °C por 24 horas para garantir a completa dissolução do poloxamer.

4.2.8. Incorporação do AU livre e das dispersões sólidas no hidrogel

Inicialmente, uma quantidade do ácido ursólico ou dispersões sólidas equivalentes a 0,3% (p/v) de UA foi dispersa em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p / v). Em seguida, o poloxamer foi lentamente adicionado a esta solução resultante em um banho de gelo sob agitação magnética constante (100 rpm) durante um período de 30 minutos. As soluções foram armazenadas em geladeira a 4 °C por 24 horas para garantir a completa solubilização (adaptado de SHAZLY et al., 2012).

Tabela 3. Nomenclatura e abreviação dos hidrogéis desenvolvidos.

Abreviação	Hidrogéis obtidos
HP	Hidrogel de poloxamer
HP_NaCl	Hidrogel de poloxamer + NaCl
HP_NaCl_AU	Hidrogel de poloxamer + NaCl com ácido ursólico
HP_NaCl_DS2	Hidrogel de poloxamer + NaCl com dispersão sólida 2 sem fármaco
HP_NaCl_DS2_AU	Hidrogel de poloxamer + NaCl com dispersão sólida 2 com fármaco
HP_NaCl_DS16	Hidrogel de poloxamer + NaCl com dispersão sólida 16 sem fármaco
HP_NaCl_DS16_AU	Hidrogel de poloxamer + NaCl com dispersão sólida 16 com fármaco

4.2.9. Análises Reológicas

As propriedades reológicas dos hidrogéis foram analisadas em triplicata a temperatura de 25±0,5°C e 32±0,5°C em reômetro de tensão controlada AR2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) com o emprego de geometria placa/placa que possui um diâmetro de 40 mm e com *gap* de 200 µm. Alíquotas das formulações foram cuidadosamente dispostas sobre a base metálica do equipamento a fim de evitar ao máximo o cisalhamento das amostras. Em seguida, as amostras ficaram 3 minutos em repouso na base para atingir o equilíbrio antes da análise (VICTORELLI *et al.*, 2018).

4.2.9.1 Ensaio reológico contínuo

O ensaio reológico contínuo foi realizado para determinar as propriedades de fluxo dos hidrogéis usando uma taxa de cisalhamento variando de 0 a 700 s⁻¹ (curva ascendente) e de 700 a 0 s⁻¹ (curva descendente). Para análise quantitativa das formulações quanto ao comportamento de fluxo, o índice de consistência e o índice de fluxo foram determinados por meio da lei da potência descrita na Equação 5.

$$\tau = k \cdot \gamma^n \text{ (Equação 5)}$$

na qual σ corresponde a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ a taxa de cisalhamento (1/s); k o índice de consistência [(Pa. s)ⁿ], e o n indica o índice de fluxo.

4.2.9.2 Ensaio reológico oscilatório

No ensaio reológico oscilatório as medidas foram realizadas ao longo de uma faixa de frequência de 0,1-10 Hz sob a aplicação de uma tensão constante de 1 Pa, a qual encontrou-se dentro da região viscoelástica linear. O módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') foram registrados. A variação de G' a baixas frequências em um gráfico log-log de G'' versus ω segue a lei da potência descrita na Equação 6.

$$G' = S \cdot \omega^n \text{ (Equação 6)}$$

em que G' é o módulo de armazenamento (Pa), S é a força da formulação (Pa. s), ω é a frequência de oscilação (Hz) e o n é o expoente de viscoelasticidade (BALOGLU *et al.*, 2011).

4.2.10. Determinação da temperatura de transição de fase sol-gel dos hidrogéis

A temperatura de transição de fase sol-gel foi determinada em reômetro, com a monitorização da variação dos módulos elásticos (G'), com temperatura na faixa de 15 a 37°C a uma frequência fixa de 0,01 Hz em uma amplitude de tensão da região viscoelástica (MAYOL *et al.*, 2008).

4.2.11. Análise do perfil de textura dos hidrogéis

A análise do perfil de textura das formulações foi realizada em um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems) operando no modo TPA, o qual a partir dos dados das curvas (força x tempo) foi determinado os parâmetros, dureza, compressibilidade, adesividade e coesão (BRUSCHI, 2006). As amostras (10 g) foram transferidas para cinco tubos de centrífuga de 50 mL, centrifugadas (4000 rpm/3 minutos) e mantidas em repouso durante 24 horas, com a finalidade de remover as bolhas de ar e deixar a sua superfície lisa. Posteriormente a formulação foi posicionada embaixo da sonda analítica cilíndrica (10 mm de diâmetro), programada para comprimir a amostra duas vezes a uma profundidade de 10 mm em velocidade de 0,5 mm/s⁻¹ e retornar com a mesma velocidade na superfície da amostra,

com um intervalo de 5 s entre as compressões. As análises foram realizadas em cinco replicatas em temperatura ambiente (CALIXTO *et al.*, 2015).

4.2.12. Estudo de Bioadesão *in vitro*

A bioadesão foi avaliada por meio da medida da força máxima e trabalho necessário para destacar as formulações da superfície da pele de orelha de porco, utilizando-se para isso o analisador de textura A-XT *plus*, operando no modo *Adhesion Test*. As peles de orelha de porco foram previamente dermatomizadas na espessura de 500 μm , com uso de um dermatômetro (Nouvag TCM 300) e hidratadas com solução de NaCl 0,9% por 15 minutos. Os fragmentos de pele com o auxílio de anéis de borracha foram fixados na sonda analítica cilíndrica.

Em seguida, um tubo de centrífuga (50 mL) contendo a formulação foi posicionado embaixo da sonda analítica e mantido imerso em banho maria em temperatura de $32\pm 0,5$ °C. O ensaio teve início com a descida da sonda a uma velocidade constante (1 mm/s^{-1}) até o encontro da pele com a formulação. A pele e a formulação foram mantidas em contato durante 60 s. Posteriormente, a pele foi separada da formulação com a subida da sonda analítica a $0,05\text{ mm/s}^{-1}$, gerando uma curva (força x tempo) representada graficamente (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2016).

4.2.13. Estudo de Liberação *in vitro*

4.2.13.1. Análise quantitativa do ácido ursólico nos ensaios de liberação

Para possibilitar a quantificação do fármaco em solução receptora (tampão fosfato de sódio 30 mM, pH = 7,4 + laril sulfato de sódio 1,25% p/v) nos estudos de liberação foi necessário avaliar os parâmetros de linearidade e seletividade em meio receptor conforme adaptação de um método analítico validado e desenvolvido por Wang *et al.* (2017).

4.2.13.2. Determinação da solubilidade do ácido ursólico em solução receptora

O meio receptor foi constituído por tampão fosfato de sódio 30 mM (pH = 7,4) + 1,25% (p/v) de laril sulfato de sódio. A solubilidade do fármaco foi determinada com a adição de um excesso do mesmo em meio receptor sob condições acima da saturação. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação por 24 horas em agitador (homogeneizador de sangue) a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas (5000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF (0,45 μm). Por fim a solução

resultante foi diluída e analisada a partir do método analítico validado. As análises foram realizadas em triplicata (n=3).

4.2.13.3. Perfil de liberação do ácido ursólico *in vitro*

Inicialmente foi realizado o preparo de uma suspensão do fármaco livre (3mg/mL) em tampão fosfato de sódio 30mM + lauril sulfato de sódio 1,75% (p/v). Ainda, para permitir o estudo da liberação do fármaco nas DS usando células de Franz uma quantidade de dispersão sólida equivalente a concentração de 0,3% (p/v) de AU foi dispersa em água purificada.

O perfil de liberação do AU nas formulações foi avaliado em equipamento (Hanson Microette HANSON 0700-1251) constituído por seis células de Franz, com a utilização de membrana sintética de polietersulfona (0,45 μ m) e solução receptora, composta por tampão fosfato de sódio 30mM + lauril sulfato de sódio a 1,25% (p/v) atendendo as condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade. As formulações semi-sólidas foram pesadas (300 mg) e as líquidas foram pipetadas (300 μ L) e ambas foram transferidas para o copo dosador, colocado sobre a membrana disposta na célula de Franz com área de exposição de 1,77 cm². Os experimentos foram realizados a 32 \pm 0,5 °C com agitação constante da solução receptora a 300 rpm (VICTORELLI *et al.*, 2018). Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 horas e filtradas em membrana de PTFE (0,45 μ m). A quantificação do AU na solução receptora foi realizada por CLAE. Os resultados foram apresentados em gráficos para a definição do modelo matemático de cinética a partir do *SigmaPlot* versão 11. A equação 7, demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade liberada (Q real) de fármaco em função do tempo (ABDULBAQI *et al.*, 2018):

$$Q = Ct \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \text{ (Equação 7)}$$

Em que:

Q (μ g/cm²): quantidade de fármaco liberada no tempo t;

Ct (μ g/mL.cm²): concentração obtida no referido tempo t;

V_r (mL): volume de solução receptora, 7 mL;

C_c (μ g/mL.cm²): concentração da amostra coletada anteriormente

V_c (mL): volume de amostra coletado;

4.2.14. Estudo de permeação cutânea *in vitro*

Os experimentos de permeação foram realizados durante estágio BEPE na Universidade de Valência, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Melero Zaera, utilizando amostras de pele abdominal humana obtida de cirurgia estética, nº do protocolo de ética: H1540295606992. O excesso de gordura e os tecidos conjuntivos foram removidos e as amostras armazenadas em freezer a -26°C por até três meses. As membranas epidérmicas foram preparadas pela técnica de separação de calor. Após a pele ser imersa em água a temperatura de 60°C por 45 segundos, a epiderme foi cuidadosamente separada da derme subjacente (MELERO et al., 2008).

Os estudos de permeação *in vitro* foram conduzidos utilizando células de vidro tipo Franz com uma área de difusão de $1,76\text{ cm}^2$ e 12 mL de volume, colocadas no módulo de aquecimento ($32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e agitação (300 rpm) para simular as condições fisiológicas (MELERO et al., 2008). A solução receptora foi composta de uma solução tampão de fosfato de sódio 30 mM (pH 7,4) + 1,25% (p/v) de lauril sulfato de sódio, garantindo a condição *sink* durante todo o teste. Alíquotas de 0,2 mL foram coletadas nos tempos de 1,5, 3, 4,5, 6, 18, 19,5, 21, 22,5, 24, 25,5, 27, 28,5 e 30 horas e filtradas em membrana de PTFE ($0,45\text{ }\mu\text{m}$). As formulações semi-sólidas foram pesadas (500 mg) e as líquidas foram pipetadas ($500\mu\text{L}$) e transferidas para o compartimento doador.

Circunferências de pele foram montadas nas células de difusão com o lado do estrato córneo em contato com o compartimento doador e o lado dérmico em contato com o meio receptor. Ambos foram equilibrados por 1 hora, e então as bolhas de ar foram removidas das células de difusão. Em seguida, as amostras foram coletadas em intervalos de tempo especificados do compartimento do receptor, seguidas da reposição da solução receptora fresca (MELERO et al., 2008). A concentração de fármaco na solução receptora foi determinada a partir do método previamente validado.

4.2.14.1. Cálculo dos parâmetros cinéticos de permeação

Os estudos foram realizados sob condições de “dose infinitas”, considerando que a concentração da formulação no compartimento doador, não muda consideravelmente durante o experimento. As condições *sink* foram mantidas durante o estudo, uma vez que a concentração de ácido ursólico no compartimento receptor não excedeu 10% da concentração de saturação. A quantidade cumulativa de ácido ursólico permeada por unidade de área (Q_{real}) versus tempo foi calculada usando a mesma equação da liberação (Equação 7).

Os parâmetros cinéticos da permeação, como o fluxo de fármaco através da pele no estado de equilíbrio (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) e o coeficiente de permeabilidade aparente (K_p , cm^2/s) foram calculados. O fluxo (J) foi calculado a partir da inclinação da porção linear da curva (Equação 8) e o tempo de latência (T_l) foi calculado extrapolando a porção linear da curva para o eixo tempo. O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado usando a relação derivada da lei da difusão de Fick's, conforme a equação 9 (JOSE *et al.*, 2015).

$$J = \frac{m}{A} \text{ (Equação 8)} \quad K_p = \frac{J}{C} \text{ (Equação 9)}$$

Em que:

J : fluxo

A : área da superfície de difusão;

m : inclinação da porção linear da curva;

K_p : coeficiente de permeabilidade

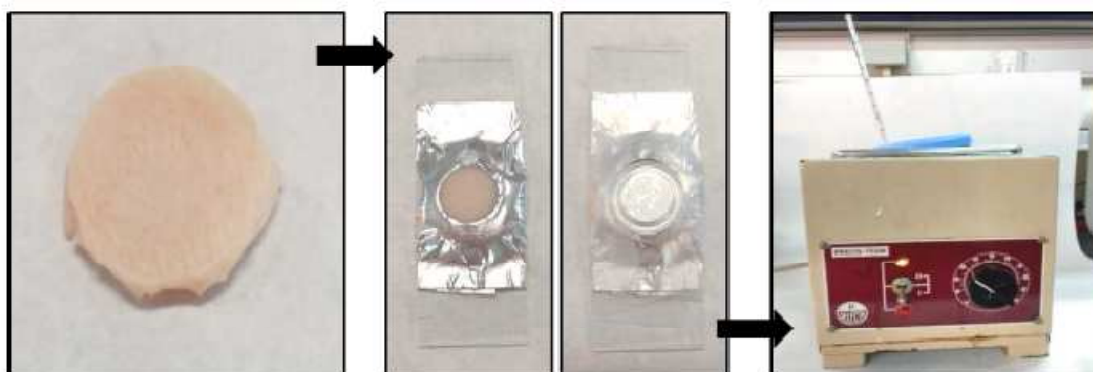
C : concentração inicial de fármaco no compartimento doador.

4.2.15. Avaliação da penetração cutânea *in vitro*

Os ensaios de penetração cutânea foram realizados separadamente dos estudos de permeação por meio da técnica de tape-stripping para permitir a análise da distribuição do fármaco em seções das diferentes camadas da pele, especialmente no estrato córneo. Os experimentos foram conduzidos com o uso de peles de orelha de porco, pois a quantidade de pele humana era limitada e insuficiente para o estudo de penetração cutânea para todas as formulações.

Portanto, discos da pele de orelha de porco de espessura total, com diâmetro igual a 2,5 cm foram obtidos. A pele foi limpa com água e o excesso de umidade foi removido com algodão. As formulações foram pesadas (100 mg) e colocadas no compartimento superior (doador) em contato com o estrato córneo da pele. O compartimento doador foi coberto com Parafilm e papel alumínio para evitar a evaporação da água das formulações e para manter condições oclusivas. As amostras de pele foram transferidas para um recipiente e incubadas a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho termostatizado durante 4 horas, conforme mostra a Figura 7 (MELERO *et al.*, 2014).

Figura 7. Incubação da pele a temperatura de 32°C por 4 horas antes do procedimento de tape stripping.



Subsequentemente, qualquer excesso da formulação foi cuidadosamente limpo com um algodão. Então, 20 tiras de fita adesiva (Scotch® 3M) foram cortadas em um tamanho de 1 x 1 cm e cada tira foi uniformemente aplicada na amostra de pele usando um rolo de acordo com um procedimento padronizado e então removida com a pinça (MELERO et al ., 2014). Para extração do fármaco das fitas, assim como da epiderme viável após a remoção do estrato córneo. As amostras foram mantidas sob agitação orbital (170 rpm) por 24 horas. A acetonitrila foi utilizada como solvente extrator e posteriormente as amostras foram filtradas e analisadas por HPLC de acordo com o método previamente validado.

4.2.16. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade dos hidrogéis foi investigada usando o método de difusão em ágar conforme ISO 10993-5 (2009). A linhagem celular utilizadas para avaliar a citotoxicidade do fármaco e dos hidrogéis desenvolvidos foram fibroblastos L929, os quais foram cultivados em meio de cultura Dulbecco DMEM com 10% de soro fetal bovino em temperatura de 37°C±0,5, sob atmosfera com 5% de CO₂. Assim, 1mL de suspensão de células (1x10⁶ cel.mL⁻¹) e 10mL de meio de cultura foram transferidos para um frasco de cultura Corning, 75 cm². Os frascos foram incubados e ao obter uma confluência de 75-80% os ensaios foram realizados em fluxo laminar.

Na sequência, uma suspensão celular na concentração de 2 x 10⁵ cel.mL⁻¹ foi preparada, e 4 mL desta suspensão foi transferido para placas de 6 poços (Costar®), em meio Dulbecco com 5% de soro fetal bovino. As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C ± 0,5, com 5% de CO₂ por 48 horas, para permitir a adesão e a confluência da monocamada celular. A viabilidade celular mínima para o ensaio foi de 85%. A confirmação de ausência de

contaminação foi verificada com a utilização de um microscópio invertida e confirmada com a observação da confluência da monocamada. A confluência é observada quando todas as áreas disponíveis para o crescimento de células estão preenchidas e as células mantêm o contato entre elas.

Após 48 horas de incubação o meio de cultura é retirado, e cada poço das placas é lavado com 2 mL de tampão fosfato pH 7,4. O tampão fosfato foi removido da placa e acrescido de 1 mL de meio composto por ágar a 1,8% (p/v), corante vermelho neutro a 0,01% (p/v) e DMEM 2x concentrado (1:1 v/v). As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 minutos até a solidificação do ágar. Os discos de papel foram embebidos com cada formulação e fármaco a ser testado e foram colocadas no centro de cada poço das placas. Os três primeiros poços foram preenchidos apenas com meio de cultura DMEM para o controle do crescimento celular (controle negativo). O Triton-X foi utilizado com controle positivo da citotoxicidade. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Posteriormente as placas foram embrulhadas em papel alumínio, para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro. Por fim, as placas foram armazenadas em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 por 24 h. Após a incubação, os poços foram analisados macroscopicamente, e a formação de um halo claro ao redor dos discos presentes nas placas evidenciou os efeitos qualitativos relativos à citotoxicidade de cada amostra testada (RODERO *et al.*, 2018).

A interpretação dos resultados foi realizada a partir da medida do halo (cm) com o auxílio de um paquímetro, após a circunferência ser dividida em quatro quadrantes. A extensão de cada quadrante foi medida e as médias finais obtidas para cada amostra foi correlacionada ao grau de citotoxicidade segundo os parâmetros fornecidos pela Tabela 4.

Tabela 4. Grau de citotoxicidade das formulações a partir do método de difusão em agar.

Grau	Citotoxicidade	Zona de citotoxicidade (halo)
0	Ausência	Ausência de descoloramento sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoloramento limitada à área sob a amostra.
2	Branda	Zona de descoloramento a partir da amostra até 0,5 cm.
3	Moderada	Zona de descoloramento a partir da amostra entre 0,5 a 1,0 cm.
4	Severa	Zona de descoloramento maior que 1,0 cm.

4.2.17. Avaliação da atividade inflamatória in vivo

4.2.17.1. Animais

Camundongos albinos machos da linhagem Swiss (25 - 30 g), provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fármacos e Medicamentos, FCFAr/UNESP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12 horas claro/escuro), com livre acesso a água e ração, durante todo o período experimental. A utilização de animais para realização dos experimentos foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Unesp, Protocolo CEUA/FCF/CAr: 47/2018.

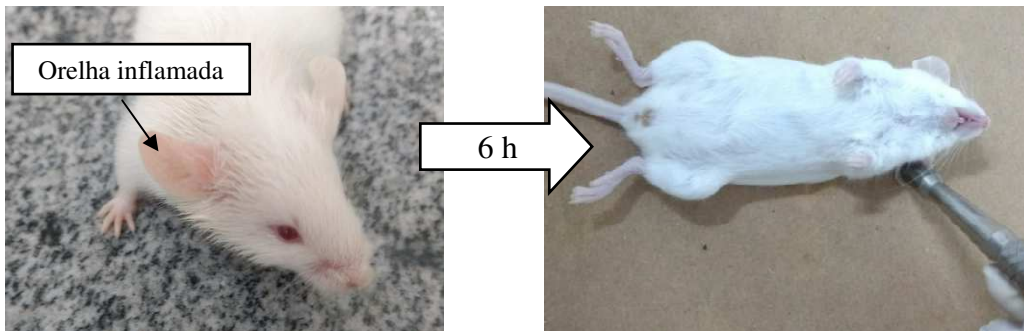
4.2.17.2. Experimento

Inicialmente os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (Cetamin[®] Syntec, Brasil) na dose de 145 mg/Kg, via intraperitoneal. Cada grupo de 6 animais recebeu um tratamento específico (aplicação tópica de 20 mg/orelha direita) com cada formulação a ser testada, sendo que um grupo não recebeu nenhum tratamento (controle negativo) e um outro grupo foi tratado com uma formulação comercial de dexametasona (controle positivo).

O processo inflamatório cutânea foi induzido via administração tópica de 20 μL de óleo de cróton (2,5% v/v) dissolvido em acetona na superfície interna da orelha direita dos camundongos (superfície: $\sim 1 \text{ cm}^2$), 30 minutos após receber o tratamento com as formulações desenvolvidas. A orelha esquerda permaneceu sem tratamento (MAS *et al.*, 2016).

Assim, seis horas após a administração do óleo de cróton e o tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por dióxido de carbono (CO_2) via inalatória. Posteriormente as orelhas direita e esquerda foram seccionadas em circunferências de 6,0 mm de diâmetro usando punch dermatológico e pesadas (mg) em balança analítica (Figura 7). A resposta edematosa foi medida como a diferença de peso entre a circunferência das orelhas direita e esquerda. A atividade anti-inflamatória foi expressa na porcentagem da redução do edema em camundongos tratados em comparação com os camundongos controle (BARICEVIC *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2016).

Figura 8. Representação do experimento *in vivo* de edema de orelha induzido por aplicação tópica de óleo de cróton.



4.2.18. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* versão 6. Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados de cada ensaio foram analisados estatisticamente por ANOVA. Múltiplas comparações entre os grupos foram determinadas com o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação de método analítico para análise quantitativa de ácido ursólico

5.1.1 Conformidade do sistema cromatográfico

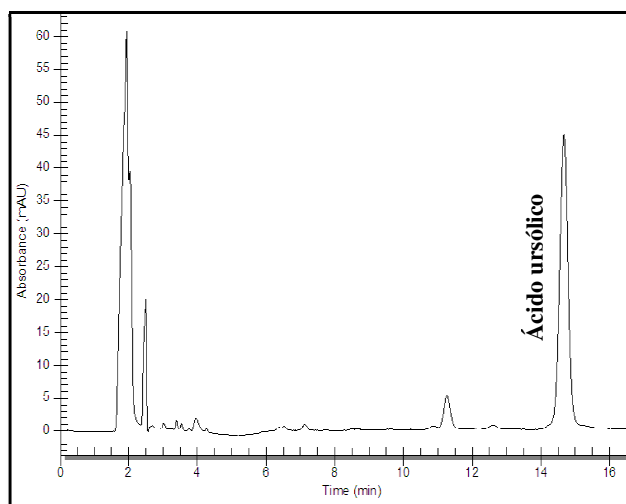
O número de pratos da coluna foi superior a 2000, como requerido, e as médias dos valores de assimetria e fator de cauda estão abaixo do valor preconizado de 2. Ainda, como mostrado na tabela 2, verificou-se a precisão nos valores obtidos da área do pico e tempo de retenção, com valor de D.P.R < 5%, como mostra a Tabela 5 (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 33, 2010). Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram que o método e o equipamento utilizados para realizar as análises são adequados, garantindo assim a confiabilidade dos resultados. O cromatograma obtido pelo método proposto (Figura 9) demonstra a resolução e a simetria do pico correspondente ao AU, com tempo de retenção de 14,8 minutos.

Tabela 5. Parâmetros estudados para avaliar a conformidade do sistema cromatográfico empregado para análise do AU.

Injeções	Área	TR	Fator de cauda (T)	Número pratos (N)	Assimetria
1	397127,9	14,900	0,900	6695,93	1,000
2	405998,3	14,891	0,950	6695,93	1,000
3	393803,2	14,888	0,950	6695,93	1,000
4	401329,0	14,903	1,000	6695,93	1,100
5	405610,2	14,897	1,000	6695,93	1,000
6	397425,3	14,855	1,000	6695,93	1,100
Média	400215,7	14,889	0,967	6695,93	1,033
DP	4944,08	0,02	0,040825	0	0,05164
D.P.R %	1,24	0,13	4,223258	0	4,997398

tR: tempo de retenção (min); DP: desvio padrão e D.P.R: desvio padrão relativo.

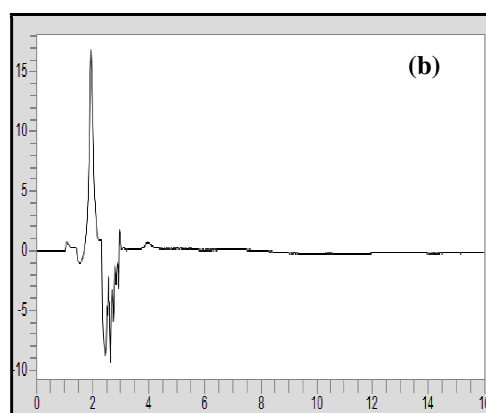
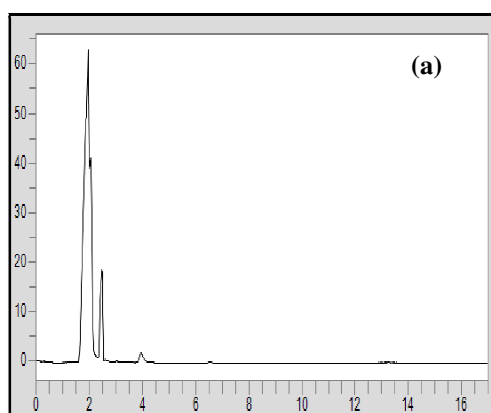
Figura 9. Cromatograma do ácido ursólico obtido pelo método cromatográfico proposto.

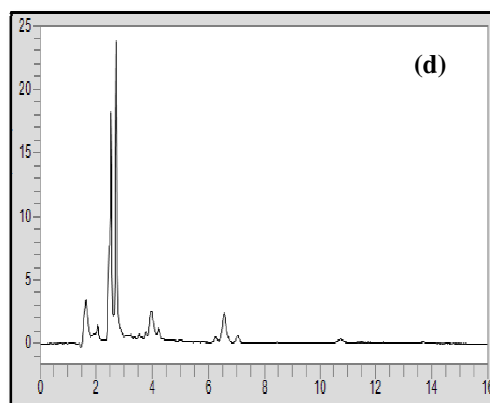
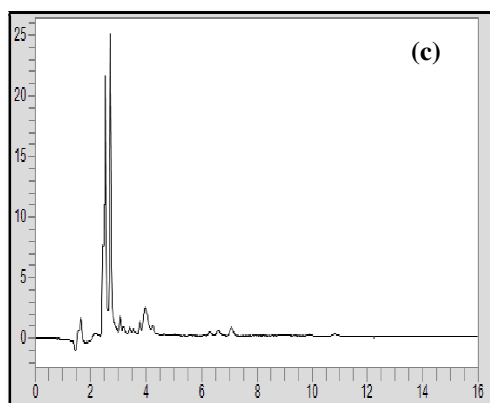


5.1.2. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método injetaram-se os componentes da fase móvel (água e acetonitrila) e as dispersões sólidas sem ácido ursólico. Os resultados mostraram que tanto as formulações sem o fármaco quanto os componentes da fase móvel não interferiram na análise do AU, uma vez que não apresentaram picos cromatográficos coincidentes com o tempo de retenção específico do mesmo, como demonstra as Figuras 10 (a-d).

Figura 10. Cromatograma da acetonitrila (a); Cromatograma da água (b); Cromatograma das DS constituídas por PVP K-30 e TPGS sem AU (c); Cromatograma das DS constituídas por PVP K-30 e P407 sem AU (d).





5.1.3. Linearidade

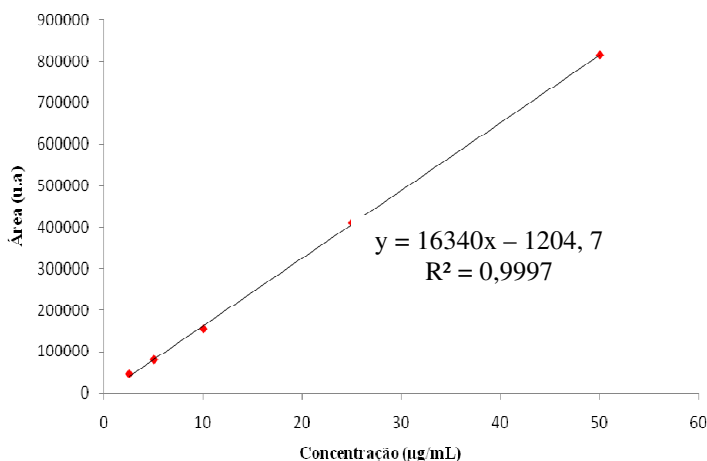
As médias das áreas dos picos cromatográficos obtidos foram utilizadas para o estudo da regressão linear a partir do método dos mínimos quadrados. Os valores das áreas dos picos mostraram-se diretamente proporcionais às concentrações do AU, dentro do intervalo avaliado, demonstrando que método empregado é linear na faixa de 2,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11). A análise de variância ANOVA comprovou que a regressão linear é significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e que não há diferença significativa entre as três curvas analíticas ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) a partir dados obtidos no intervalo de 95% de confiança (Tabela 6) (PINTO, 2017).

Tabela 6. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de AU.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	1238405534756	309601383689	1701,61	3,48
Regressão Linear	1	1237868708015	1237868708015	6803,48	4,96
Desvio da Linearidade	3	536826741	178942247	0,98	3,71
Dentro (resíduo)	10	1819463710	181946371	-	-
Total	14	1240224998467	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05\%$

Figura 11. Curva analítica do ácido ursólico em acetonitrila. Fase móvel: 88:12 (v/v) acetonitrila: água; Coluna: C18 (4,6 mm x 250mm; 5µm) fluxo: 0,95 mL/min.; λ: 203 nm; Injeção: 20µL; 25°C.



5.1.4. Precisão

Para garantir a confiabilidade das análises do fármaco, o método deve ser preciso, ou seja, os resultados de uma série de leituras de uma mesma amostra devem ser próximos uns dos outros (BRASIL, 2016). Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 indicam que o método é preciso, pois o valor de D.P.R% para todas as determinações nos ensaios de precisão intracorrída e precisãointercorrídas foi inferior à 5%, como preconizado pela legislação vigente.

Tabela 7. Precisão intracorrída do método analítico para análise de AU.

N	Concentração teórica(µg/ml)	Concentração real (µg/mL)	Áreas
1	25	23,97	390490,40
2	25	24,72	402653,27
3	25	25,25	411394,80
4	25	23,73	386594,60
5	25	25,20	410524,92
6	25	24,39	397256,53
Média	-	-	399819,10
D.P.R %	-	-	2,56

Tabela 8. Precisão intermediária do método analítico para análise de AU.

N	Concentração (µg/ml)	Analista e dia	Médias	D.P.R %
6	25	1	412640,2	0,49
		2	411016,8	2,60

5.1.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um mesmo ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). A RDC n°166 de 2017 admite variações na faixa de trabalho entre 80-120%, porém valores próximos a 100% são desejáveis (BRASIL, 2017). Os valores obtidos, conforme mostra as Tabelas 9 e 10, encontram-se dentro dos limites preconizados, indicando que o método utilizado é exato.

Tabela 9. Exatidão do método analítico para análise de AU nas DS constituídas por PVP-K30 e TPGS.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Exatidão (%)	D.P.R (%)
2,5	2,71	108,4	0,47
25	26,36	105,4	1,90
50	48,98	98,0	0,68

Tabela 10. Exatidão do método analítico para análise de AU nas DS constituídas por PVP-K30 e P407.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Exatidão (%)	D.P.R (%)
2,5	2,67	107,0	3,68
25	25,79	103,2	1,31
50	52,01	104,0	0,79

5.1.6. Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) indicam a sensibilidade do método analítico. Os valores de LD e de LQ foram calculados a partir das equações descritas nos itens 10.2.2.3-10.2.2.4e corresponderam a 0,367 µg/mL e 1,112 µg/mL, respectivamente, demonstrando a capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações de AU.

5.1.7. Robustez

Os resultados obtidos para robustez, conforme mostra a Tabela 11 revelaram que o método analítico proposto mostrou-se robusto frente a pequenas variações na composição e vazão (mL/min) da fase móvel, uma vez que em todas as condições testadas o método manteve-se preciso e exato.

Tabela 11. Robustez do método analítico para análise de AU.

Condições cromatográficas	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)	Precisão (%)
Vazão (mL/min)			
0,900	26,81	107,3	1,82
0,950	25,09	100,4	0,39
1,000	24,83	99,3	0,20
Fase Móvel			
86,8% ACN:13,2% H ₂ O	25,82	103,3	2,13
88,0% ACN:12,0% H ₂ O	26,81	107,3	1,82
89,2% ACN:10,8% H ₂ O	27,93	111,7	2,24

*ACN: acetonitrila; H₂O: água.

5.2. Planejamento fatorial completo para obtenção de dispersões sólidas.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial completo (2⁴) delineado para otimizar a obtenção de dispersões sólidas a partir da técnica de rotoevaporação. Os resultados do planejamento apresentados na Tabela 10 foram discutidos separadamente para cada resposta obtida.

Tabela 12. Planejamento fatorial completo (2^4) para obtenção de dispersões sólidas.

Formulações	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Solubilidade (mg/mL)	Teor (%)	Diâmetro médio ± DP (µm)
1	-1	-1	-1	-1	3,70	104,8	48,21 ± 27,17
2	1	-1	-1	-1	3,03	103,7	84,05 ± 81,46
3	-1	1	-1	-1	4,17	107,3	56,65 ± 48,24
4	1	1	-1	-1	2,54	107,6	69,56 ± 50,02
5	-1	-1	1	-1	5,14	101,8	95,84 ± 89,63
6	1	-1	1	-1	2,94	95,1	83,46 ± 56,12
7	-1	1	1	-1	3,45	104,7	96,30 ± 76,34
8	1	1	1	-1	2,82	99,9	128,96 ± 84,22
9	-1	-1	-1	1	2,07	108,3	90,84 ± 74,74
10	1	-1	-1	1	1,70	54,5	121,81 ± 96,77
11	-1	1	-1	1	1,98	98,7	142,91 ± 177,35
12	1	1	-1	1	1,67	88,4	86,17 ± 44,77
13	-1	-1	1	1	3,57	103,2	97,40 ± 49,36
14	1	-1	1	1	2,06	106,3	99,80 ± 50,42
15	-1	1	1	1	3,77	108,1	100,23 ± 49,55
16	1	1	1	1	2,64	109,2	114,79 ± 58,47

5.2.1. Estudo de solubilidade do AU nas dispersões sólidas

A avaliação da solubilidade foi realizada para verificar a influência dos carreadores e do processo de obtenção das DS na solubilidade do fármaco. Porém, como o AU livre é uma molécula altamente hidrofóbica, não foi possível verificar a sua solubilidade em água, pois não ocorreu a detecção do fármaco pela técnica de CLAE. Os valores da solubilidade aquosa do fármaco a partir das dispersões sólidas estão apresentados na Tabela 10.

De acordo com os resultados obtidos e considerando o valor teórico da solubilidade do AU em água de acordo com a literatura $1,02 \times 10^{-4}$ mg/L (US EPA), as dispersões sólidas apresentaram um aumento muito significativo na solubilidade aquosa do fármaco quando comparado com o fármaco livre. O aumento da solubilidade a partir de dispersões sólidas já foi observado para ácido ursólico (ELOY *et al.*, 2015) e também para outros fármacos hidrofóbicos, como o celecoxibe (HOMAYOUNI *et al.*, 2014) e rilpivirina (KOMMAVARAPU *et al.*, 2015).

Esse fenômeno pode ser explicado pela conversão do fármaco do estado cristalino para o estado amorfo, visto que as formas amorfas são desordenadas e possuem uma barreira energética inferior a ser superada pelas moléculas para entrarem em solução em comparação com um sólido cristalino que é altamente estruturado (PATIL *et al.*, 2013; HANCOCK, 1995).

Além disso, o aumento da solubilidade do fármaco está relacionado com as propriedades físico-químicas dos carreadores utilizados para preparação das DS. A contribuição do PVP K-30 para o aumento da solubilidade do AU pode ser devido à formação de complexos solúveis entre esse carreador polimérico hidrofílico com o fármaco (SETHIA *et al.*, 2004).

O emprego dos tensoativos, tanto do P407 quanto do TPGS pode ter levado a uma maior molhabilidade devido à redução da tensão interfacial entre as moléculas de AU e a água, além de permitir a solubilização micelar do fármaco em meio aquoso (KARATAŞ *et al.*, 2005; SETHIA *et al.*, 2002).

5.2.2. Determinação do teor de fármaco nas dispersões sólidas

Os resultados apresentados na Tabela 12 revelam que o teor de fármaco nas dispersões sólidas varia entre 88,4 % a 109,2% e mostraram que a maioria dos valores obtidos experimentalmente são próximos aos valores teóricos de fármaco que foi adicionado nas formulações, indicando a eficiência da técnica de preparo. Em estudos realizados por Potluri *et al.* (2011) e Eloy *et al.* (2012) dispersões sólidas obtidas por meio da técnica de rotoevaporação também demonstraram valores de conteúdo de fármaco entre 80 e 100%.

5.2.3. Análise da distribuição de tamanho das partículas de dispersões sólidas.

O tamanho de partículas foi verificado a partir da determinação do diâmetro de Feret a 0° (Df), que é determinado a partir da distância média estabelecida entre duas linhas paralelas tangenciais ao perímetro projetado da partícula (PUND *et al.*, 2011). As partículas analisadas apresentaram valores de diâmetro médio entre 48,21 e 142,91 µm, como apresentado na Tabela 12. Esses resultados foram próximos ao encontrados para DS de ácido ursólico desenvolvidas em um estudo prévio, no qual o diâmetro médio das partículas ficou entre 59,38 e 115,70 µm (ELOY *et al.*, 2012).

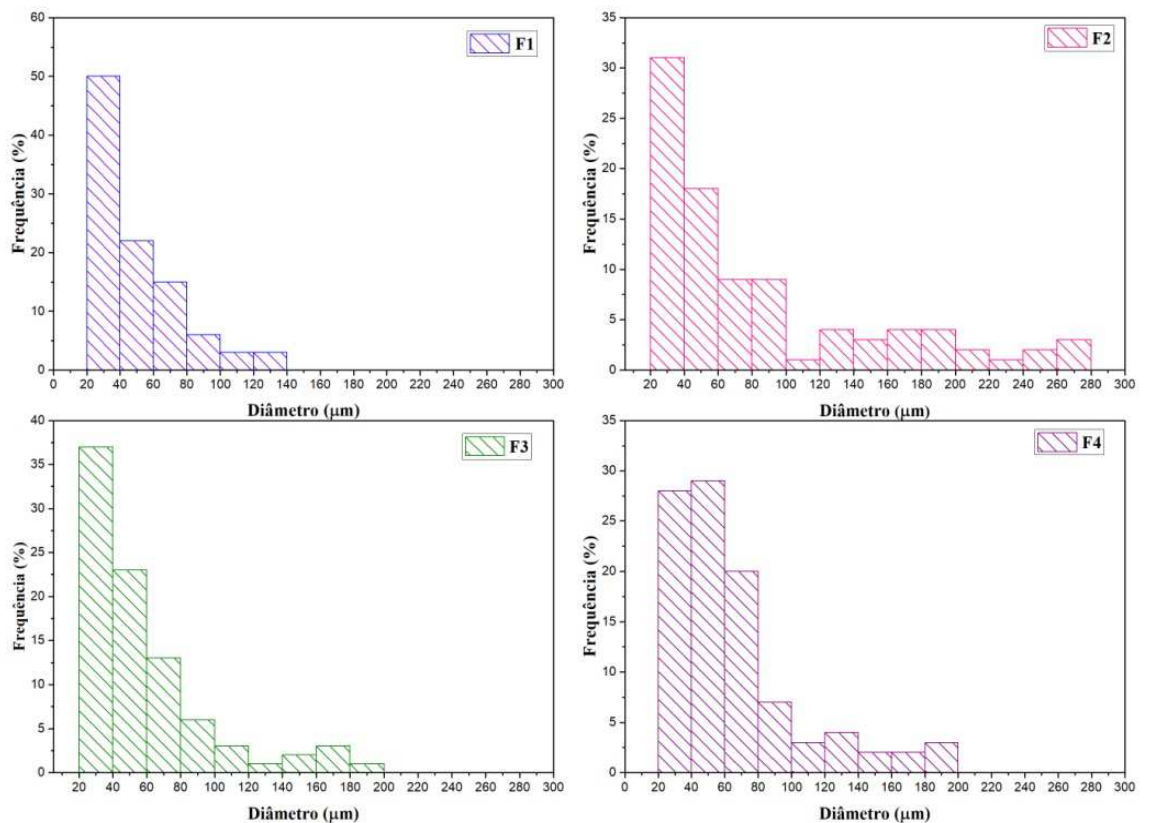
A análise de distribuição do tamanho de partícula das dispersões sólidas foi realizada para uma população de 100 partículas de cada amostra. Os dados foram apresentados em

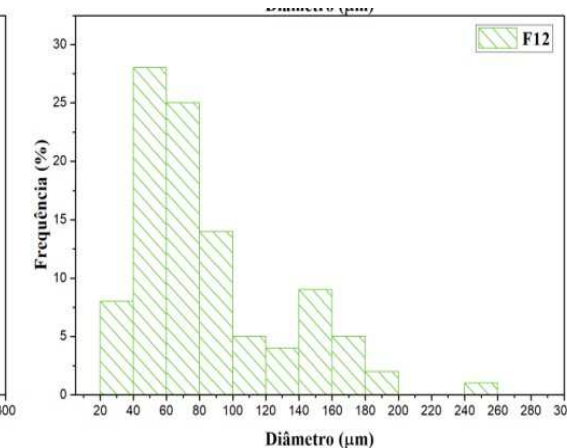
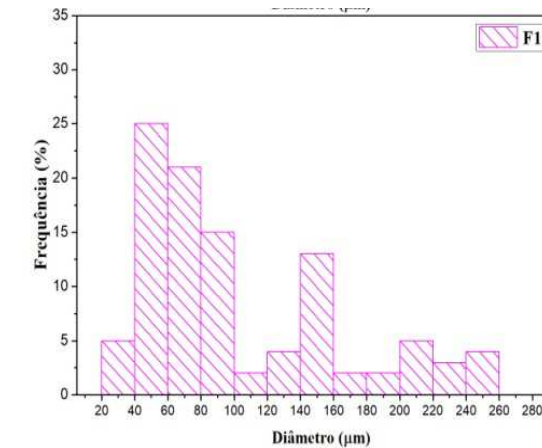
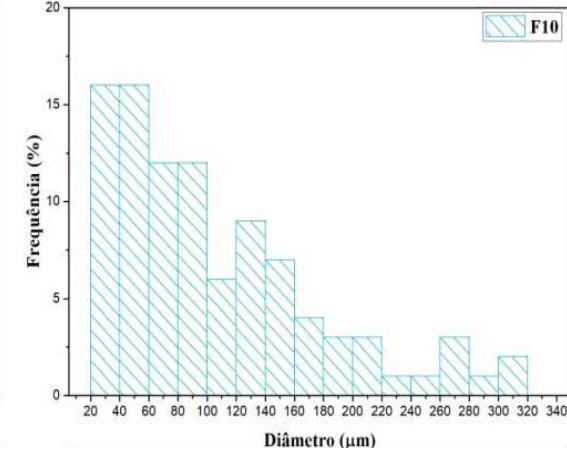
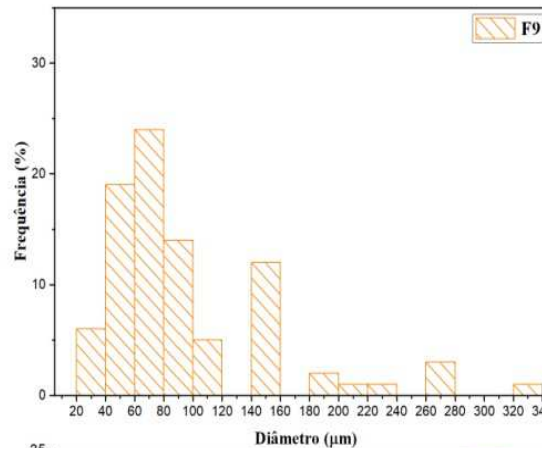
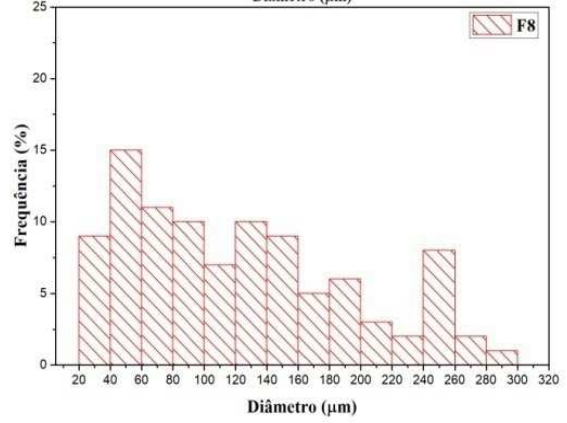
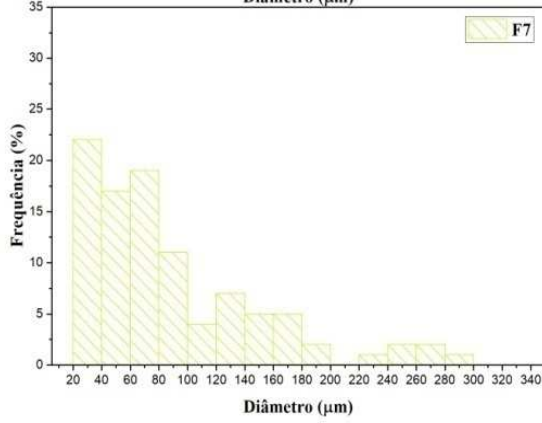
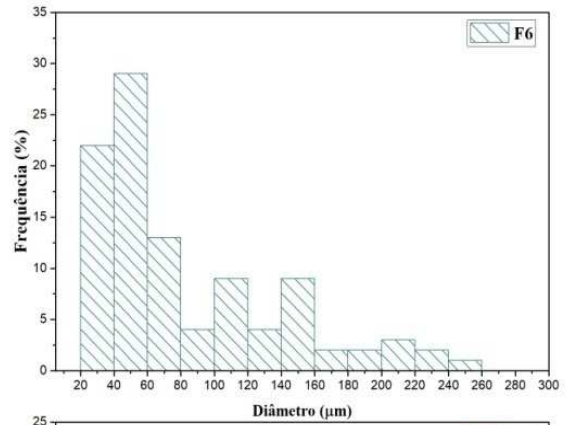
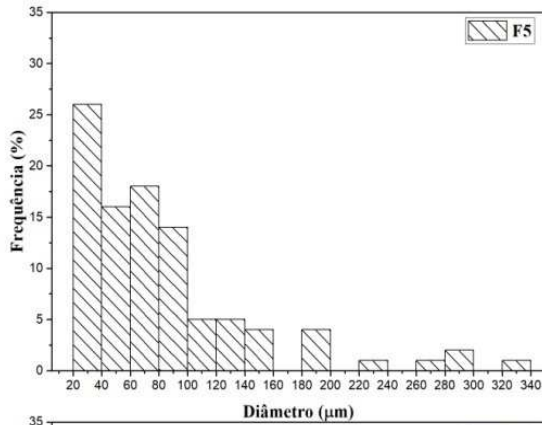
função da frequência percentual dos grupos de tamanhos obtidos e organizados na forma de histogramas (Figura 12).

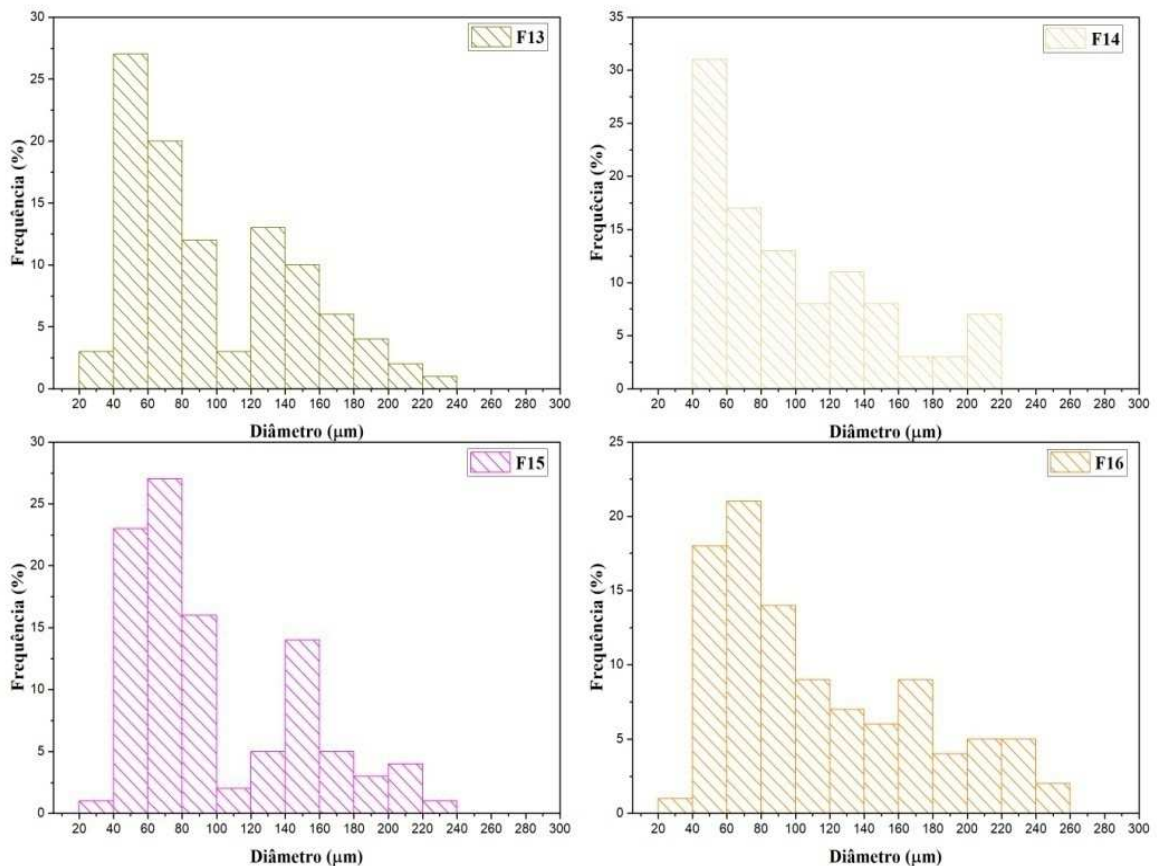
De maneira geral o perfil de distribuição do tamanho das partículas variou entre 20 e 340 μm , verificou-se que as amostras constituídas por poloxamer 407 (1 a 8) apresentaram maior frequência de partículas com tamanhos menores entre 20 e 80 μm , enquanto que as formulações (9 a 16) que apresentaram TPGS em sua composição mostraram tamanhos de partículas mais frequentes na faixa entre 40 e 100 μm .

A não homogeneidade de tamanho na população de partículas pode ser atribuída à técnica de rotoevaporação que foi utilizada para o preparo das dispersões sólidas. A variação do tamanho das partículas não afetou a incorporação das dispersões sólidas nos hidrogéis, como pode ser observado na figura 26 os hidrogéis mostraram-se homogêneos sem a precipitação de partículas.

Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula das dispersões sólidas.







5.2.4. Efeito das variáveis nas respostas

Após a realização do planejamento fatorial, a próxima etapa foi identificar quais foram as variáveis estudadas que exerceram um efeito significativo para cada uma das respostas avaliadas.

O efeito de uma variável demonstra a alteração ou não na resposta quando o nível (-1) passa para nível (+1). Dessa forma, os efeitos de cada variável foram calculados por meio da multiplicação dos valores codificados (-1 e 1) de cada uma das variáveis pela resposta e realização da soma e divisão desses resultados por 8, uma vez que o planejamento contém 8 níveis baixos (-1) e 8 níveis altos (+1) (PEREIRA FILHO, 2017).

Para visualização da influência dos efeitos nas respostas foram construídos gráficos de probabilidade, onde cada um dos efeitos encontra-se relacionado com áreas iguais de uma curva gaussiana e cada média das áreas calculadas está relacionada com um valor de z (probabilidade). Todos os cálculos foram realizados utilizando funções do *Microsoft*

Excel(PEREIRA FILHO, 2017). A Figura 13, 14 e 15 mostra o gráfico dos efeitos dos fatores avaliados *versus* resposta para solubilidade, teor % e diâmetro médio de partícula.

Figura 13.Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados *versus* resposta) para a solubilidade.

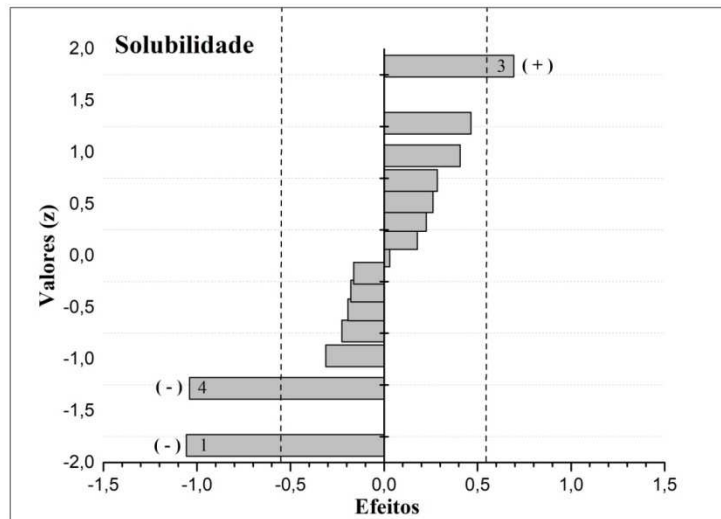


Figura 14.Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados *versus* resposta) para teor (%).

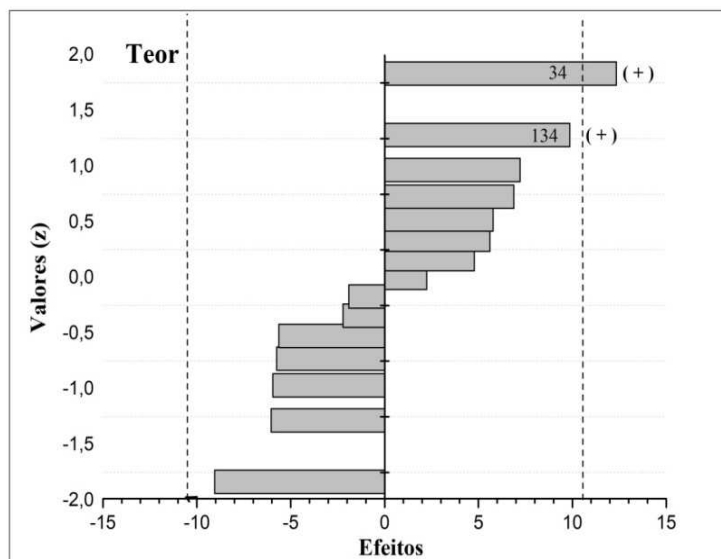
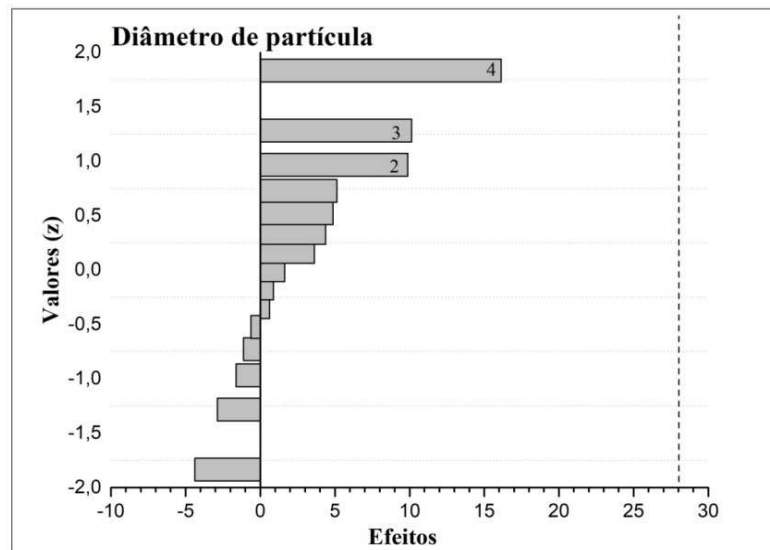


Figura 15. Gráfico de probabilidade (efeito dos fatores avaliados *versus* resposta) para o diâmetro de partícula.



Os efeitos menores encontram-se aglomerados e ao redor do zero, enquanto os efeitos importantes estão afastados do zero (PEREIRA FILHO, 2017).

Assim, para a resposta solubilidade (Figura 13) foi possível identificar que a proporção (p/p) de fármaco:polímero:tensoativo (variável X_1), a agitação em rpm (variável X_3) e o tipo de tensoativo (variável X_4) exerceram efeitos importantes. Os efeitos no teor (%) de fármaco das dispersões sólidas (Figura 14) foram relevantes para variável X_1 , interação da variável $X_{3,4}$ e a interação entre $X_{1,3,4}$. Por fim, para o diâmetro médio de partículas (Figura 15) observou-se que as variáveis fundamentais foram a X_2 , X_3 e X_4 .

O efeito da variação do volume de solvente e de sua interação com as demais variáveis foi irrelevante para a resposta solubilidade, assim como foi observado para o teor de fármaco nas DS. A variação da proporção de F:P:T (p/p) e suas interações também mostram um efeito pequeno na resposta diâmetro de partículas. Portanto, as variáveis que apresentaram efeitos desprezíveis para cada uma das respostas foram descartadas para reorganização do planejamento fatorial.

De acordo com a análise dos gráficos de probabilidade uma variável foi eliminada para cada resposta. A eliminação de uma variável para cada uma das respostas transformou o planejamento inicial construído a partir de 4 variáveis em 2 níveis (2^4) em um planejamento fatorial (2^3), no qual cada experimento passou a possuir 2 réplicas.

A partir da reorganização dos dados com a presença de réplicas foi possível calcular para cada uma das respostas os seguintes parâmetros: variância (s^2) e erro experimental (s); variância ($\sum a_i^2 \cdot s^2$) e erro dos efeitos. O valor de t foi calculado com 8 graus de liberdade e 95% de confiança. Por fim o intervalo de confiança de um efeito com 95% de confiança (t crítico) foi obtido pela multiplicação do valor de t pelo erro do efeito.

Desse modo, as variáveis que apresentaram um efeito com um valor superior, em módulo, ao valor de t crítico foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%. O valor de t crítico para cada resposta está apresentado nas Figuras 13, 14 e 15 na forma de linha tracejada.

5.2.4.1. Reposta solubilidade: As variáveis X_1 , X_3 e X_4 (proporção de F:P:T, agitação (rpm) e o tipo de tensoativo) demonstraram exercer um efeito significativo na solubilidade do fármaco nas dispersões sólidas, já que os valores de efeito (1, 3 e 4) foram (-1,06, 0,69, -1,04) superiores ao t crítico = $\pm 0,55$, assim isso significa que quando a proporção de F:P:T muda de 5:75:20 para 10:60:30 a solubilidade do fármaco reduz em média a 1,1 mg/mL. Além disso, a solubilidade do fármaco nas DS preparadas com agitação de 100 rpm foi em média 0,7 mg/mL superior quando comparada com a solubilidade do fármaco nas DS obtidas a agitação de 50 rpm.

O tipo de tensoativo também influenciou na solubilidade do AU, sendo que para as DS contendo P407 os valores foram em média 1 mg/mL maiores que para as DS que possuem TPGS em sua composição, isso se deve ao fato de que o P407 (EHL = 18-23) é mais hidrofílico que o TPGS (EHL = 13,2) e, portanto, promove uma maior solubilidade do fármaco em meio aquoso (KOLAŠINAC et al, 2012; ZHANG et al., 2012).

5.2.4.2. Resposta teor (%): As interações entre as variáveis X_3 e X_4 , ou seja quando ambas estavam no mesmo nível, mostraram ter um efeito significativo no teor (%) de fármaco das DS (valor do efeito = 12,34 e t crítico = $\pm 10,51$). Dessa forma, o aumento no teor de fármaco nas DS foi evidenciado com a variação simultânea da agitação (rpm) e do tipo de tensoativo, ou seja, o teor foi maior nos casos em que o rpm e o tipo de tensoativo estavam no mesmo nível. Apesar de esses dados indicarem a ocorrência de um possível efeito sinérgico ainda essa questão precisa ser mais investigada.

5.2.4.3. Resposta diâmetro médio de partícula: Nenhuma das variáveis estudadas influenciou significativamente o diâmetro médio das partículas de DS.

Ainda, uma importante observação foi que a variação do volume de solvente de 20 para 30 mL não interferiu nem positivamente e nem negativamente em nenhuma das respostas, demonstrando que as DS sólidas podem ser obtidas com um menor volume de solvente gerando menos resíduos para o ambiente.

De maneira geral, verificou-se que a maioria das variáveis estudadas influenciou na solubilidade do AU presente nas DS, apesar da variação de alguns fatores terem mostrado um efeito estatisticamente significativo nas respostas. Os valores das respostas ainda foram muito próximos uns dos outros, e mesmo com a variação de algumas condições experimentais as características das formulações foram mantidas sugerindo que o método de obtenção das DS é robusto.

Portanto a seleção das formulações para as próximas investigações baseou-se nos melhores resultados de solubilidade para as DS constituídas de P407 e TPGS, uma vez que o aumento da solubilidade do AU é um dos principais objetivos do trabalho, as formulações selecionadas encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Dispersões sólidas selecionadas para as análises subsequentes.

Formulações	F:P:T % (p/p)	Tensoativo
DS_2	1:6:3	P407
DS_5	0,5:7,5:2	P407
DS_15	0,5:7,5:2	TPGS
DS_16	1:6:3	TPGS

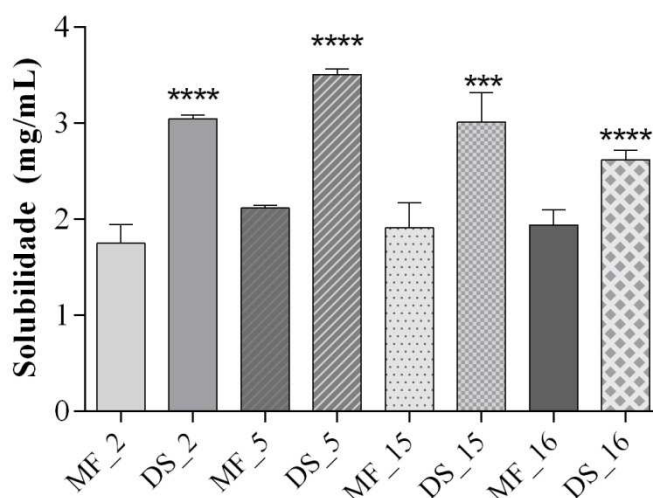
Os estudos de solubidade e teor para as DS no planejamento experimental não foram realizados em replicatas. Com o objetivo de garantir a confiabilidade desses resultados, a solubilidade e o teor foram novamente avaliados em triplicata para as dispersões sólidas selecionadas a partir do planejamento fatorial. Além disso, o estudo de solubilidade também foi realizado para as misturas físicas com a mesma composição e proporção de F:P:T (p/p) das DS e nas mesmas condições de estudo (Figura 16). Segundo os dados obtidos (Tabela 14) o teor de ácido ursólico para as DS demonstrou-se adequado na faixa de 99,3 a 115% semelhante as análises anteriores.

Tabela 14. Teor de ácido ursólico presente nas dispersões sólidas selecionadas.

Formulações	F:P:T % (p/p)	Teor(%)
DS_2	1:6:3	99,3±2,51
DS_5	0,5:7,5:2	105,8±3,17
DS_15	0,5:7,5:2	102,1±1,19
DS_16	1:6:3	115,0±4,70

*Média ± DP (n = 3)

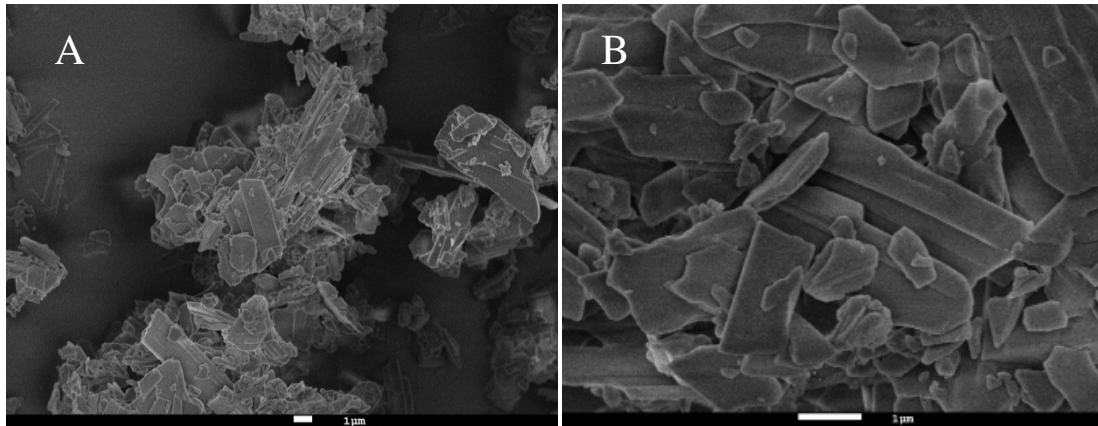
Os valores de solubilidade aquosa (mg/mL) do ácido ursólico já a partir das simples misturas físicas foram significativos. No entanto, as dispersões sólidas (DS_2, DS_5, DS_15 e DS_16) mostraram uma solubilidade significativamente ($p < 0,05$) maior em relação aos valores obtidos para as misturas físicas (MF_2, MF_5, MF_15 e MF_16) confirmando a eficiência desses sistemas no aumento da solubilidade do ácido ursólico.

Figura 16. Solubilidade aquosa de misturas físicas e dispersões sólidas.

5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

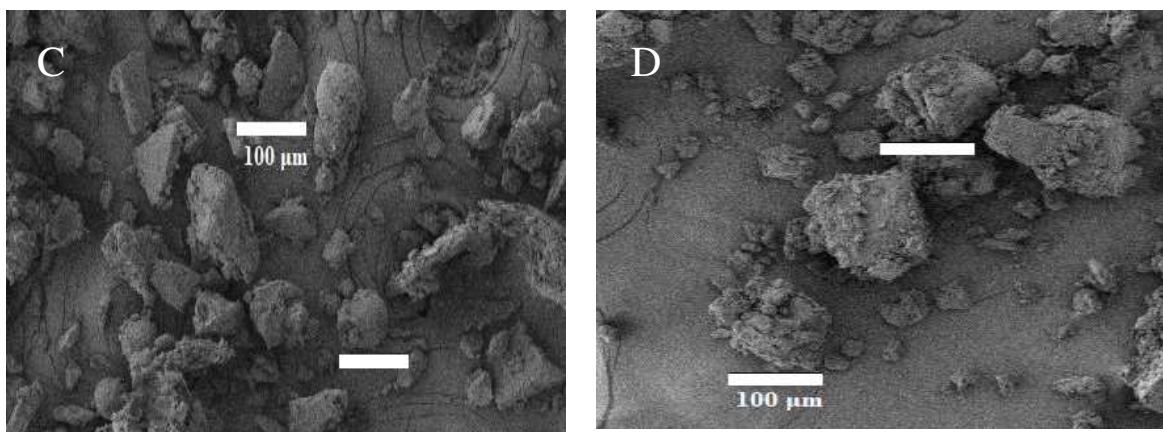
A técnica de MEV foi utilizada para analisar a morfologia do ácido ursólico assim como das dispersões sólidas obtidas. A fotomicrografia referente ao AU (Figura 17) revela que esse fármaco encontra-se na forma de cristais com superfície lisa, assim como foi anteriormente observado em um trabalho desenvolvido por Eloy e Marchetti (2014). A estrutura cristalina do AU também foi confirmada pelas técnicas de DSC e DRX nos itens 5.4 e 5.5 discutidos na sequência.

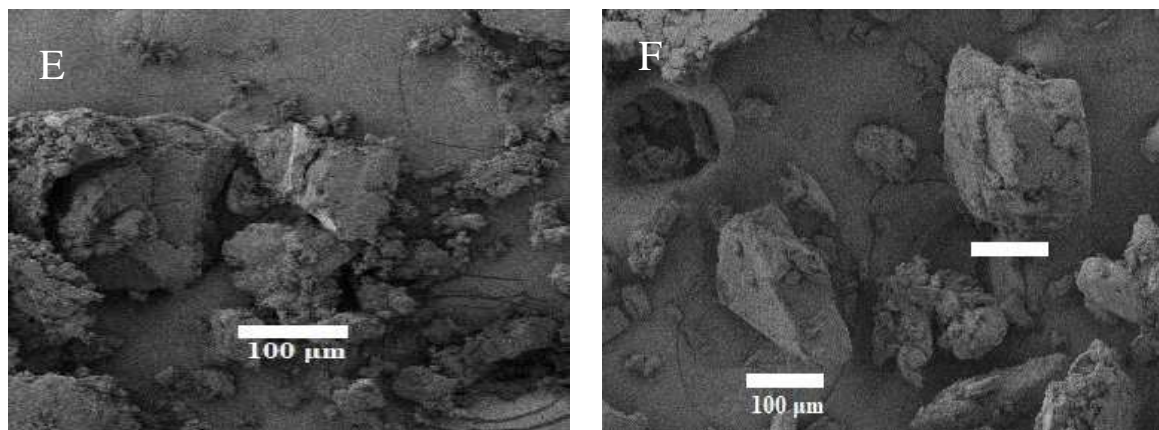
Figura 17. Fotomicrografia do ácido ursólico, no aumento de 4.000x (A) e 14.000x (B).



Ambas as dispersões obtidas constituídas por polinilpirrolidona k-30 e TPGS ou poloxamer com ou sem fármaco demonstram formas irregulares, verificou-se as partículas da DS_2 sem fármaco apresentaram um tamanho menor ($< 100 \mu\text{m}$) do que as partículas de DS com fármaco (DS2_AU), enquanto que para as partículas de DS_16 o tamanho não foi alterado com a adição do fármaco. Além disso, as partículas de DS_2 apresentaram uma determinada textura enquanto a superfície das partículas de F16 demonstrou-se mais lisas. Além disso, para ambas as dispersões contendo ácido ursólico não foram observadas partículas cristalinas de fármaco isoladamente, indicando que o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica (Figura 18).

Figura 18. Fotomicrografia das dispersões sólidas sem o fármaco DS_2 (C) e DS_16 (E) e com fármaco DS2_AU (D) e DS16_AU (E) no aumento de 50x.





5.4. Difração de raios -X

A técnica de DRX consiste na projeção de um feixe de raios X monocromático sobre os átomos que constituem o material, em um ângulo teta. A difração dos raios-X ocorre quando há uma diferença entre a trajetória percorrida pelos raios-X e o comprimento de onda da radiação incidente. As posições angulares e intensidades dos picos difratados resultantes da radiação por meio da variação do ângulo teta produzem um padrão característico de cada material (CULLITY, 2002; SAMPATH *et al.*, 2012).

A DRX além de ser uma técnica não destrutiva é muito importante na caracterização de dispersões sólidas, pois fornece informações detalhadas sobre a estrutura cristalina dos materiais, uma vez que estas estão associadas a picos definidos no espectro, enquanto que substâncias amorfas não apresentam picos de difração (KARJALAINEN *et al.*, 2005; ELOY *et al.*, 2015). Assim essa técnica permite avaliar o estado físico do fármaco nos carreadores.

Um estudo realizado por ZHOU e colaboradores (2015) investigou por meio de várias técnicas de caracterização a estrutura cristalina das duas formas polimórficas do ácido ursólico, as quais foram denominadas como forma I e forma II.

O difratograma de raios X do ácido ursólico no ângulo de difração 2θ revelou a presença de vários picos cristalinos ($5,64^\circ$, $7,80^\circ$, $11,32^\circ$, $14,45^\circ$, $14,85^\circ$ e $16,89^\circ$) que de acordo com os resultados obtidos por ZHOU *et al.* (2015) foram coincidentes com os picos de difração da forma cristalina I do AU, conforme mostra a Figura 19.

Em relação aos componentes das formulações, os tensoativos (P407 e TPGS) apresentaram dois picos de difração em 19° e 23° , mostrando que ambos possuem uma estrutura semi-cristalina (MONEGHINI *et al.*, 2010), enquanto que o PVP por ser um material completamente amorfo, não mostrou nenhum pico (SETHIA, 2004).

Os difratogramas das misturas físicas (MF_2) e (MF_5) constituídas por fármaco, PVP e P407 na proporção 1:6:3 (p/p) e 0,5:7,5:2 (p/p) mostraram a presença de picos característicos do ácido ursólico e dos componentes da matriz, como em destaque na Figura 20. Os picos referentes ao AU presentes nas misturas físicas possuem menor intensidade em relação aos picos do fármaco isolado (100%), uma vez que apenas 5% e 10% (p/p) de fármaco estão presentes nas formulações. Dessa forma, esses dados indicam que o processamento das misturas físicas não alterou a estrutura cristalina das moléculas de ácido ursólico, assim como já foi observado em estudos anteriores para o ácido ursólico (ELOY *et al.*, 2012) e para misturas físicas de outros fármacos, como cetoconazol (KUMAR *et al.*, 2011).

Para as dispersões sólidas (DS2) e (DS5) constituídas por fármaco, PVP e P407 na proporção 1:6:3 (p/p) e 0,5:7,5:2 (p/p) verificou-se que os difratogramas foram diferentes das misturas físicas e do AU isolado, com o desaparecimento dos picos cristalinos característicos do fármaco (Figura 19). Assim, esses resultados sugerem que o fármaco nas dispersões sólidas encontra-se disperso no estado amorfo ou molecular.

No entanto, as dispersões sólidas (DS15 e DS16) e as misturas físicas (MF_15 e MF_16) constituídas por fármaco, PVP e TPGS na proporção 0,5:7,5:2 (p/p) e 1:6:3 (p/p) não revelaram picos correspondentes ao AU na forma cristalina, apresentando um padrão de difração semelhante aos componentes que constituem as formulações, conforme mostra Figura 21. O fato dos picos de cristalinidade do AU não estarem presentes nas misturas físicas que possuem TPGS em sua composição pode ser atribuído a não homogeneidade dos pós na mistura, uma vez que esse tensoativo é um sólido ceroso.

Figura 19. Difratomogramas de raios-X do ácido ursólico do presente estudo (A) e obtido por ZHOU *et al.* (2015).

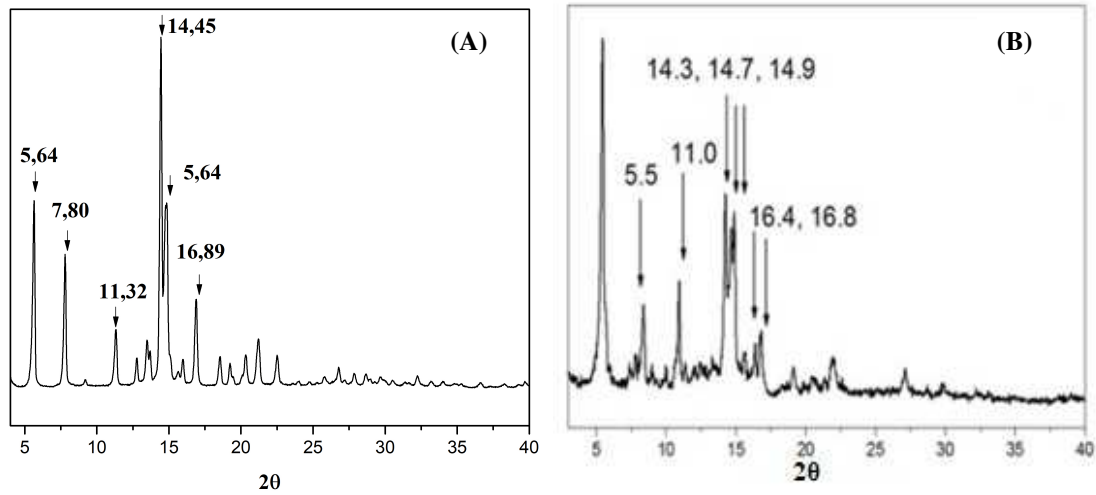


Figura 20. Difrátograma de raios-X do ácido ursólico (AU), poloxamer 407 (P407), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2 (MF_2), dispersão sólida 2 (DS_2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS_5).

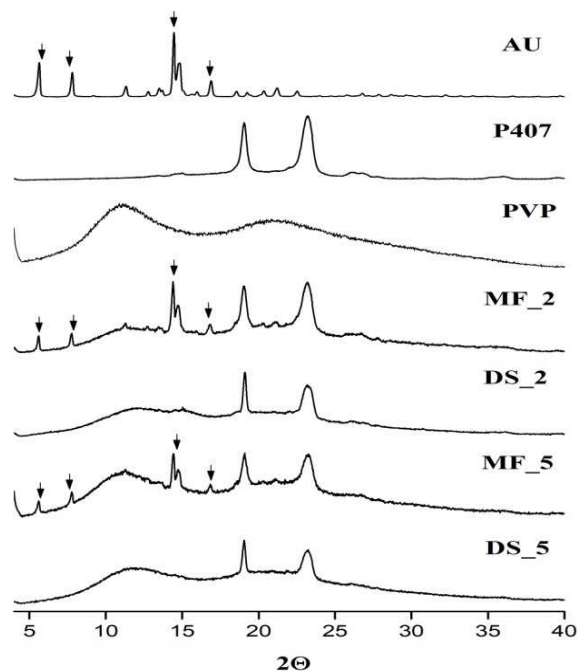
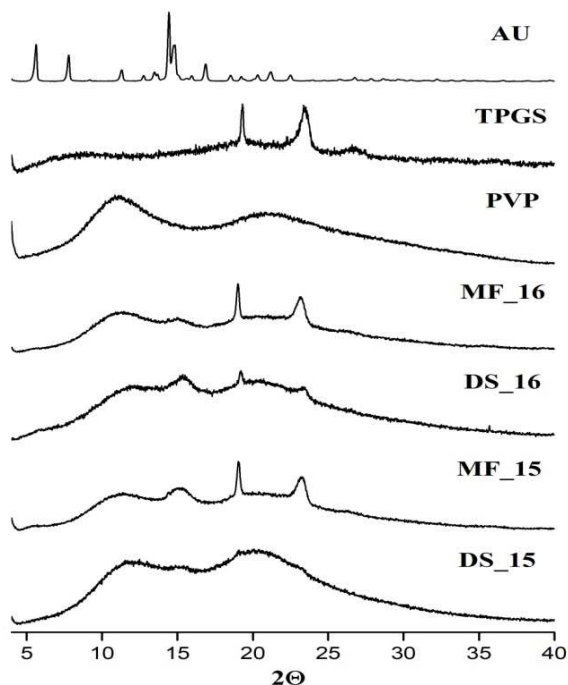


Figura 21. Difratoograma de raios-X do ácido ursólico (AU), D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 16 (MF_16), dispersão sólida 16 (DS_16), mistura física 15 (MF_15) e dispersão sólida 15 (DS_15).



5.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria de exploratória diferencial é uma das técnicas mais importantes no processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, visto que fornece informações precisa e rápida, sobre propriedades físicas de um material, como ponto de fusão, pureza, polimorfismo, cristalinidade, transição vítrea, interação, compatibilidade, estabilidade à oxidação, decomposição cinética, entre outras (DEMETZOS, 2008).

Nas análises de DSC, o material é aquecido, resfriado ou mantido isotermicamente e a variação de entalpia entre a amostra e um material de referência é registrada. Assim, a variação de entalpia em função da temperatura permite a identificação dos possíveis eventos térmicos que a amostra pode sofrer (DUNCAN, 2006).

Essa técnica é importante na caracterização de dispersões sólidas, pois pode indicar se o fármaco está disperso no estado amorfo ou cristalino, sendo que se o fármaco estiver na forma cristalina, o seu pico de fusão será observado na curva de DSC, enquanto a ausência do pico de fusão do fármaco sugere que o mesmo encontra-se disperso no estado amorfo ou molecular (CIDES *et al.*, 2006), confirmando os resultados de difração de raio-X.

A curva de DSC do fármaco livre revelou dois eventos térmicos, o primeiro é um pico exotérmico com $T_{\text{onset}}=199,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um valor de $\Delta H = -16,30\text{ J/g}$ e o segundo é um pico endotérmico com $T_{\text{onset}}= 282,95^{\circ}\text{C}$ e um valor de $\Delta H = 72,89\text{J/g}$ referente ao ponto de fusão do fármaco. Esses dados corroboram os resultados de DRX comprovando que o fármaco encontra-se na forma polimorfa I, pois o perfil de DSC do AU no presente estudo foi semelhante ao observado por ZHOU *et al.* (2015) nas curvas de DSC da forma I obtidas a taxa de aquecimento de (f) $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e de (g) $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$, conforme mostra a Figura 22.

Na Figuras 23 e 24, as curvas de DSC dos carreadores utilizados na obtenção das misturas físicas e dispersões sólidas revelaram picos endotérmicos característico de fusão em $T_{\text{onset}}= 56,03\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{onset}}=32,37^{\circ}\text{C}$ para poloxamer 407 e TPGS (GUO *et al.*, 2013; KOLAŠINAC *et al.*, 2012). A curva correspondente ao PVP demonstrou uma ampla variação endotérmica entre $60,84$ e $138,87^{\circ}\text{C}$ e o evento próximo a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ que representa a desidratação do polímero, devido à sua natureza amorfa e higroscópica (ALVES *et al.*, 2014).

O pico endotérmico referente à fusão do AU ($282,95^{\circ}\text{C}$) não foi detectado nas curvas de DSC para todas as misturas físicas e dispersões sólidas desenvolvidas (Figura 23 e 24). O perfil de DSC previsto para as misturas físicas seria a somatória entre os eventos térmicos do fármaco e dos carreadores, dado que a simples mistura dos pós geralmente não permite que ocorram interações entre eles.

O desaparecimento do endoterma de fusão nas misturas físicas pode ter ocorrido pelo fato de que nas análises de DSC, os carreadores (PVP K-30, P407 e TPGS) se fundem a uma temperatura inferior a de temperatura de fusão do fármaco podendo levar a solubilização em suas matrizes ou até mesmo devido a não detecção do fármaco no equipamento em função da sua pequena quantidade nos sistemas. Esses achados também foram relatados por alguns trabalhos anteriores (YUANA *et al.*, 2013; ZHAI *et al.*, 2017).

No entanto, a ausência do pico de fusão do AU nas dispersões sólidas pode indicar que o mesmo encontra-se molecularmente disperso ou no estado amorfo, sem cristalinidade remanescente coincidindo com os resultados obtidos por DRX.

Além disso, as curvas de DSC (Figura 23) das misturas físicas (c) e dispersões sólidas (d) constituídas por ácido ursólico, PVP e P407 na proporção de 1:6:3 (p/p) evidenciaram um evento exotérmico em a $T_{\text{onset}}= 174^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = -27,23\text{ J/g}$) e a $T_{\text{onset}}= 140,50^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = -41,02\text{ J/g}$). Assim como as misturas físicas e dispersões sólidas na proporção 0,5:7,5:2% (p/p) que

também revelaram a presença de dois picos exotérmicos, o primeiro a $T_{\text{onset}}=175^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H= -19,24$ J/g) e um pico muito sutil a $T_{\text{onset}}=169,43^{\circ}\text{C}$ e ($\Delta H= -6,15$ J/g).

O aparecimento desses dois novos eventos não ocorreu nas curvas de DSC das misturas físicas e dispersões sólidas que apresentam o TPGS em sua composição. Portanto esses fatos podem estar relacionados com a interação do PVP com o P407, já que o PVP K-30 possui dois pequenos eventos exotérmicos a $153,89^{\circ}\text{C}$ e a $177,89^{\circ}\text{C}$. No entanto, para identificar melhor a presença desses eventos será necessário realizar análises de DSC das dispersões sólidas sem o fármaco.

Figura 22. (A) Curva de DSC do ácido ursólico realizada no presente estudo a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (B) Curva de DSC da forma I do AU obtida por ZHOU *et al.* (2015) estudada a diferentes taxas de aquecimento: (f) $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (g) $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (h) $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (i) $99,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

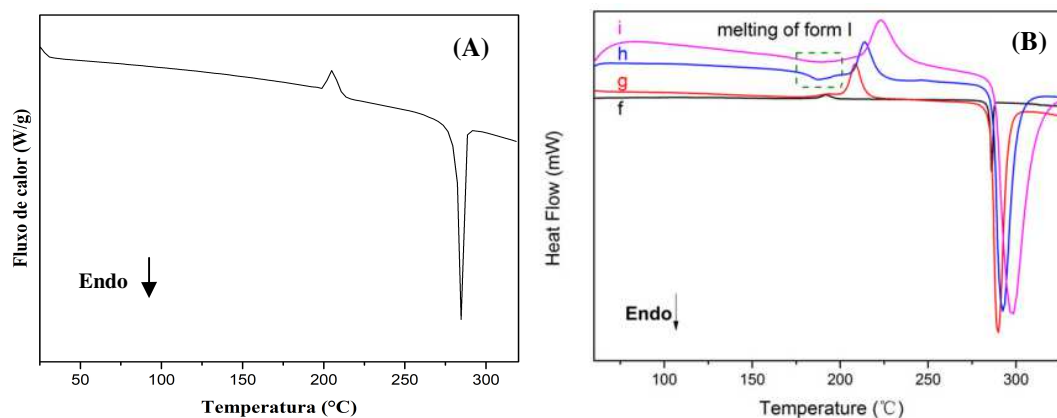


Figura 23. Curvas de DSC do ácido ursólico (AU), poloxamer (P407), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2(MF_2) e dispersão sólida 2 (DS2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS5).

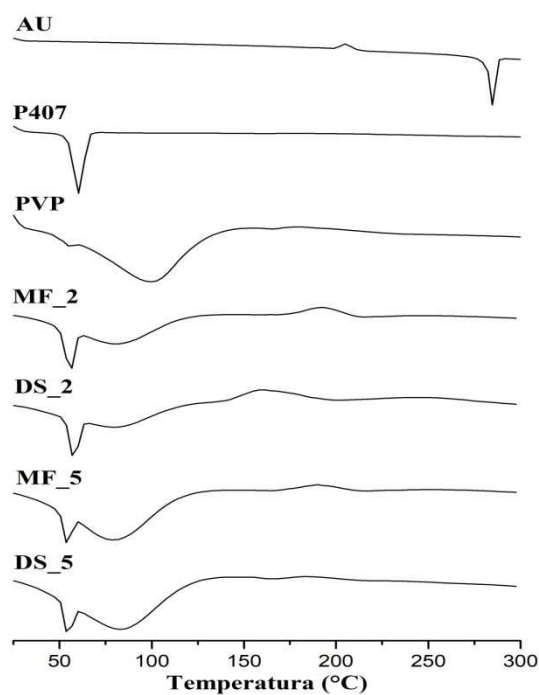
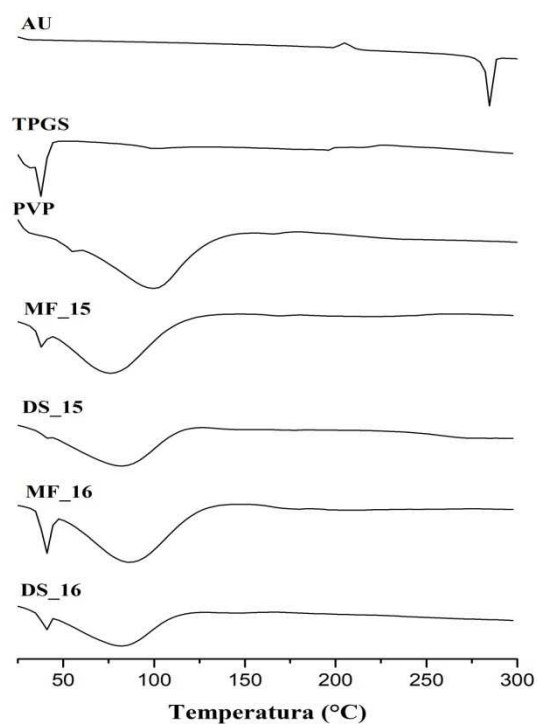


Figura 24. Curvas de DSC do ácido ursólico (AU), D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato(TPGS), polivinilpirrolidona k-30 (PVP), mistura física 2 (MF_2) e dispersão sólida 2 (DS2), mistura física 5 (MF_5) e dispersão sólida 5 (DS5).



5.6. Estabilidade físico-química das dispersões sólidas

A integridade química de uma dispersão sólida deve permanecer inalterada durante seu período de validade. Para obter uma adequada estabilidade para essas formulações, a mobilidade molecular deve ser a menor possível (GILHOTRA et al., 2012). Especialmente, no caso das DS que possuem natureza amorfa, as quais na maioria das vezes mostram-se termodinamicamente instável, pois os materiais amorfos apresentam uma tendência natural de retornar ao estado cristalino (HILDEN; MORRIS, 2004).

Os fenômenos que resultam na instabilidade de uma dispersão sólida são a nucleação e cristalização (DHIRENDRA et al., 2009). O estado físico, mobilidade molecular, antiplastização, razão fármaco-polímero, peso molecular do polímero e interações fármaco-matriz são os principais fatores capazes de afetar a estabilidade das dispersões sólidas (GILHOTRA et al., 2012).

O principal objetivo do desenvolvimento de DS de terceira geração, com o emprego de tensoativos é superar os problemas relacionados à recristalização e precipitação de fármacos (VO et al., 2013).

A adição de tensoativos na DS além de melhorar a dissolução e solubilidade do fármaco também tem efeitos benéficos na estabilidade física desses sistemas, visto que mantém a miscibilidade do fármaco na matriz e reduzem a recristalização do fármaco (CHAUDHARI; DUGAR, 2017).

As dispersões sólidas permaneceram amorfas durante toda a duração do estudo de estabilidade (90 dias), a 30°C sob 60% de umidade relativa, conforme mostram os difratogramas da Figuras 25 obtidos a partir de análises de difração de raios-X, sem a detecção de sinais de cristalização em qualquer uma das dispersões estudadas.

No entanto os difratogramas da DS2 após 60 e 90 dias revelou uma diminuição da intensidade dos picos em 19° e 23°, referentes ao poloxamer como consequência da diminuição na sua cristalinidade. Um estudo conduzido por Chokshiet al. (2007) também revelou que a presença do poloxamer como carreador em DS garantiu a estabilidade do sistema e o fármaco disperso na matriz permaneceu no estado amorfo em condições de alta temperatura (40°C) e umidade (75%) após o período de 30 dias (CHOKSHI et al., 2007).

Para DS16 foi possível observar que a partir de 30 dias de estudo houve o desaparecimento dos picos cristalinos em 19° e 23° característicos do TPGS, porém as características cristalinas do ácido ursólico permaneceram ausentes. Yuan *et al.* (2013) investigaram o efeito da concentração de TPGS na estabilidade de DS de calcitrol e verificaram que o fármaco apresentou uma melhor estabilidade nas DS com maiores concentrações de TPGS.

Em relação à avaliação do conteúdo de fármaco durante o estudo de estabilidade (Tabela 15), observou-se que o teor de ácido ursólico permaneceu praticamente constante nas DS₂, como uma redução de 6,9 % do conteúdo de fármaco após 90 dias de estudo. No entanto, para as DS₁₆ verificou-se uma redução mais acentuada do conteúdo de fármaco, com uma perda de 24,51% de ácido ursólico entre o início dos testes e após 90 dias de estudo. Dessa forma, em relação à avaliação do conteúdo de ácido ursólico nas DS, os resultados demonstraram que a DS₂_AU (constituídas por PVP, P407 e AU) foi mais estável que a DS_{F16} (constituídas por PVP, TPGS e AU) no período e condições de armazenamento investigados no estudo de estabilidade.

Figura 25. Difratoograma de raios-x da dispersão sólida DS₂ (A) e DS₁₆ (B) após estudo de estabilidade a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 0,5\%$.

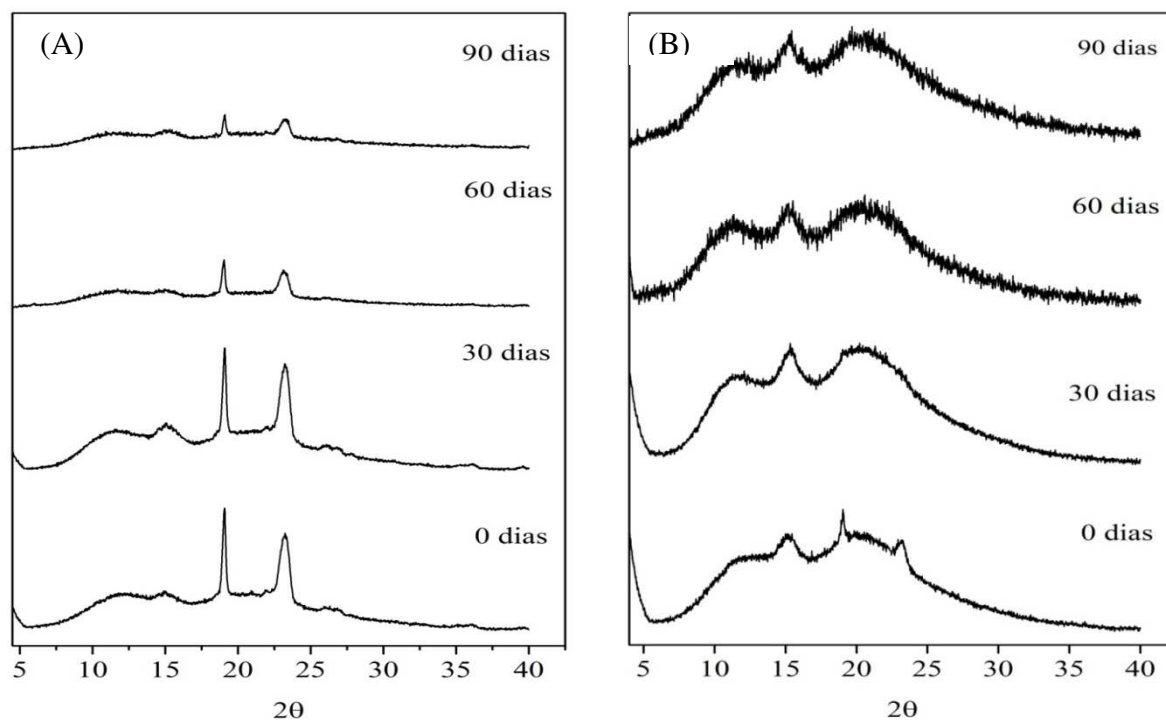


Tabela 15. Contéudo de fármaco (teor %) das dispersões sólidas DS_2 e DS_16 após estudo de estabilidade a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $60 \pm 5\%$.

Contéudo de fármaco nas dispersões sólidas (%)		
Tempo (dias)	DS_2	DS_16
0	$103,15 \pm 2,51$	$98,92 \pm 1,07$
30	$100,23 \pm 2,37$	$91,53 \pm 0,77$
60	$100,53 \pm 1,04$	$78,55 \pm 2,38$
90	$96,25 \pm 0,61$	$74,41 \pm 3,15$

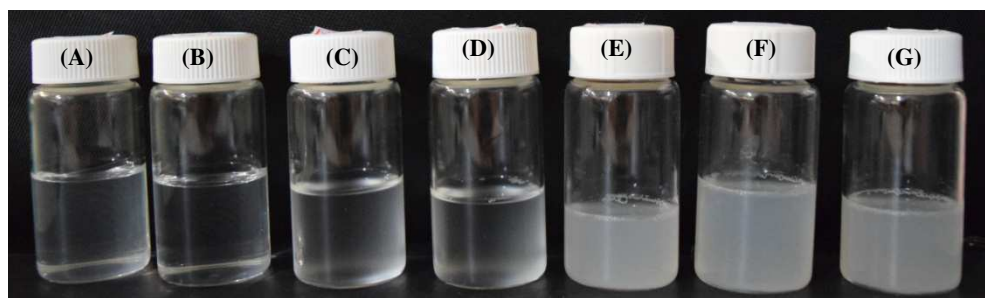
Média \pm DP (n=3)

5.7. Caracterização dos hidrogéis

5.7.1. Análise macroscópica dos hidrogéis

Os hidrogéis obtidos apresentaram macroscopicamente homogêneos, sem a presença de precipitados, sem odor e com aspecto semi-sólidos em temperatura ambiente. Além disso, a partir da análise macroscópica dessas formulações foi possível observar que todos os hidrogéis que não continham fármaco em sua composição apresentaram-se incolores enquanto que os hidrogéis na presença do ácido ursólico mostraram-se opalescentes, conforme mostra a Figura 16.

Figura 26. Fotografia do hidrogel de poloxamer (A); hidrogel de poloxamer + NaCl (B); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 2 sem fármaco (C); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 16 sem fármaco (D); hidrogel de poloxamer + NaCl com ácido ursólico (E); hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 2 com fármaco (F) e hidrogel de poloxamer + NaCl contendo a dispersão sólida 16 com fármaco (G).



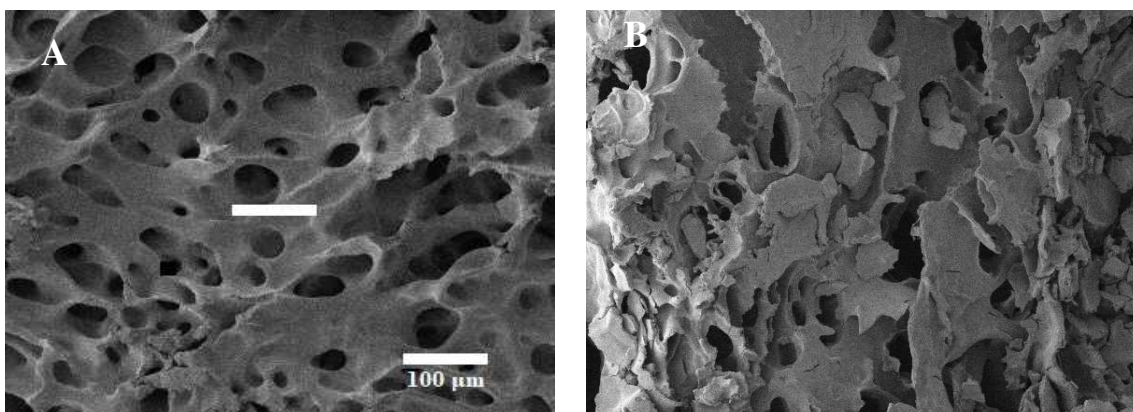
5.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

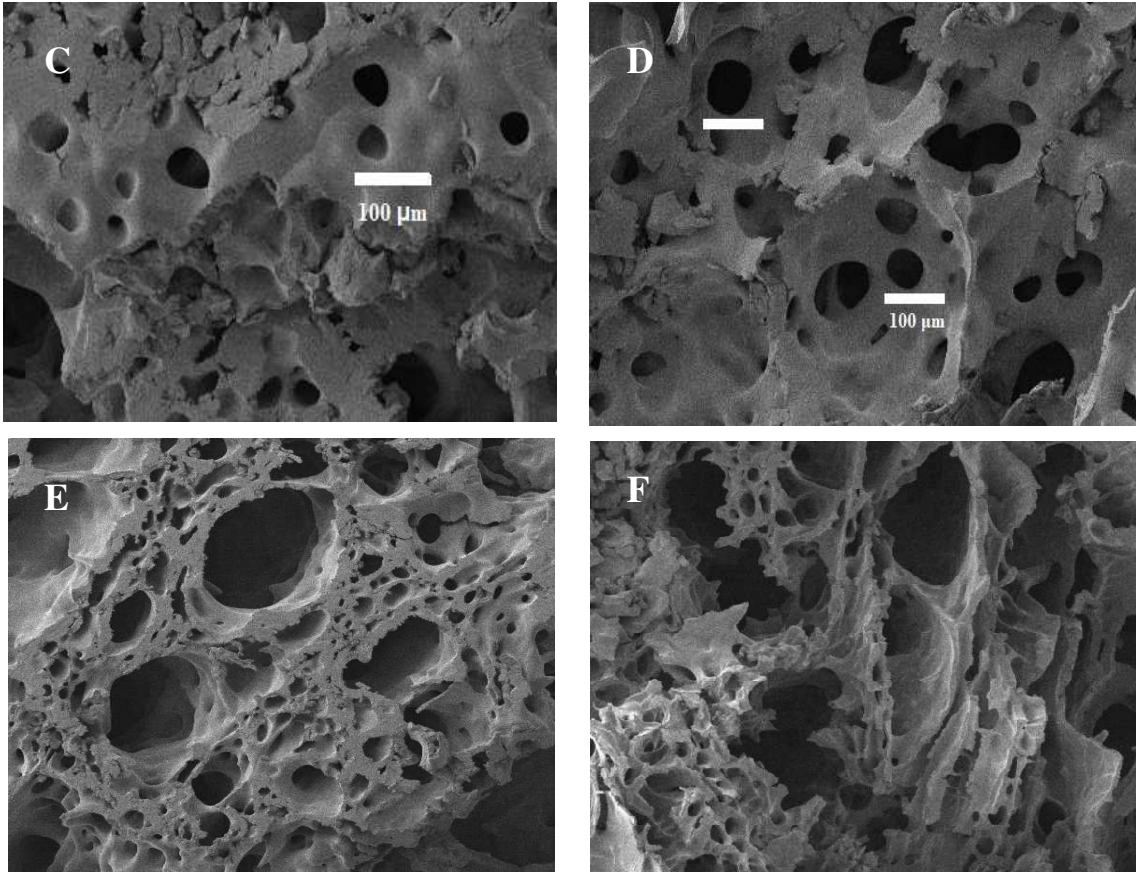
A morfologia da estrutura interna dos hidrogéis obtidos e liofilizados foi verificada por MEV. As imagens de MEV dos hidrogéis desenvolvidos revelaram uma estrutura de poros interconectados, com poros de diferentes tamanhos. Esta estrutura porosa pode proporcionar uma excelente capacidade de carga de fármacos e um perfil de liberação controlada ao hidrogel (WANG *et al.*, 2016).

Os poros com menores tamanhos foram encontrados no hidrogel contendo as DS_2 com e sem fármaco (Figura 27, C e D), enquanto que o hidrogel incorporado com DS_16 que possui o TPGS em sua composição demonstrou alguns poros de tamanhos maiores e outros de tamanho menores poros em relação aos demais hidrogéis, além de revelarem uma morfologia na forma de folhas pregueadas.

O HP_NaCl_AU (Figura 27 B) incorporado com o fármacos demonstrou uma estrutura distinta de HP_NaCl sem ácido ursólico (Figura A) mostrando que as partículas de fármacos ocuparam os poros do hidrogel. No entanto, para HP_NaCl_DS2 e HP_NaCl_DS16 (Figura 27, C e E) não verificou-se alterações na estrutura interna dos hidrogéis com a presença do fármaco em HP_NaCl_DS2_AU e HP_NaCl_DS16_AU (Figura D e F).

Figura 27. Fotomicrografia dos hidrogéis com ou sem fármaco e com ou sem as dispersões sólidas incorporadas HP_NaCl (A), HP_NaCl_AU (B), HP_NaCl_DS2 (C), HP_NaCl_DS2_AU (D), HP_NaCl_DS16 (E), HP_NaCl_DS16_AU (F), no aumento de 50x.

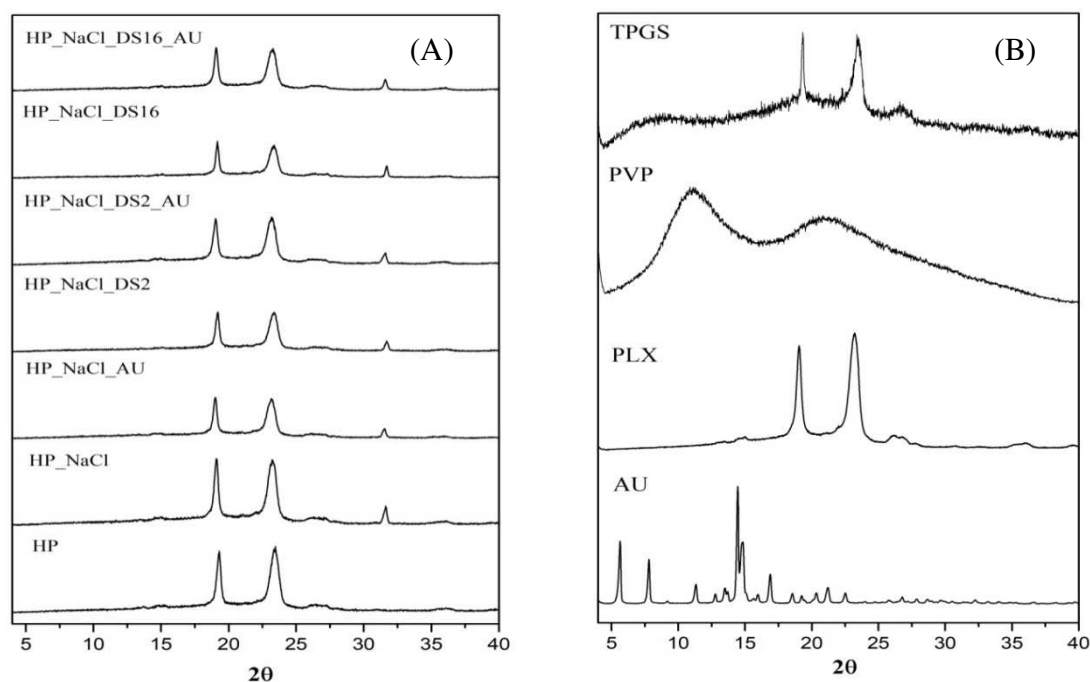




5.7.3. Difração de raios -X dos hidrogéis

Os difratogramas de raios-X obtidos para todos os hidrogéis liofilizados (Figura 28), incluindo hidrogel de poloxamer branco e hidrogel de poloxamer com NaCl, hidrogel com o AU e os hidrogéis com as dispersões DS_2 e DS_16 incorporadas demonstram um perfil predominante das características semi-cristalinas do poloxamer 407, com picos de difração bem definidos em 19° e 23° já que este polímero encontra-se em maior concentração nas formulações (MONEGHINI *et al.*, 2010). As formulações contendo cloreto de sódio demonstraram um pico em 32° referente à estrutura cristalina desse sal (ANNEN; EPPLE, 2009).

Figura 28. Difratoograma de raios-X dos hidrogéis (A) e difratograma de raios-X do fármaco e os polímeros isolados da formulação.



5.7.4. Análises reológicas dos hidrogéis

5.7.4.1. Ensaio reológico contínuo

A análise reológica contínua fornece informações sobre o comportamento de fluxo que a formulação em análise pode apresentar quando submetida a uma determinada tensão (SAVIC et al., 2011).

Dessa forma, o fluxo de uma formulação é obtido pela correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, que resulta em diagramas denominados curvas de fluxo. Essas curvas originam-se do comportamento da formulação com o aumento da taxa de cisalhamento (curva ascendente) e com a diminuição da taxa de cisalhamento (curva descendente) (ISAAC et al., 2008).

A curva ascendente permite classificar o comportamento de fluxo das formulações em Newtoniano ou não Newtoniano. Ademais o fluxo não Newtoniano pode ser do tipo pseudoplástico, dilatante ou plástico. Enquanto a curva descendente classifica as formulações quanto à tixotropia ou reopexia (SCHRAMM, 2006).

De acordo com as curvas apresentadas na Figura 29, todos os hidrogéis mostram comportamento de fluxo não Newtoniano, visto que os valores correspondentes a tensão e taxa de cisalhamento não apresentaram uma relação constante e, conseqüentemente, a taxa de

cisalhamento resultou em alterações na viscosidade aparente dos hidrogéis tanto à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ quanto à temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (SCHRAMM, 2006).

Apartir dos reogramas obtidos foi possível observar em ambas as temperaturas estudadas que para todas as formulações uma tensão de cisalhamento mínima é necessária para começarem a fluir e posteriormente passam a se comportarem como fluidos pseudoplástico ($n < 1$) (Tabela 16). Esse comportamento é muito comum para formulações constituídas por polímeros de alto peso molecular, uma vez que essas moléculas possuem muitas ligações C-C e a ligação de quatro grupos em único carbono gera uma estrutura tetraédrica com livre rotação em cada ligação, a qual permite a mobilidade das cadeias poliméricas (BRADY, 2016). Assim, diminuição da viscosidade aparente à medida que a tensão de cisalhamento é aplicada a essas formulações pode ser devido o rearranjo e alinhamento das moléculas em direção ao escoamento.

Além disso, as curvas de fluxo para hidrogel de poloxamer; hidrogel de poloxamer com NaCl; hidrogel de poloxamer + NaCl com DS_2 sem fármaco e hidrogel de poloxamer + NaCl com DS_2 com fármaco, em ambas as temperaturas de análise, apresentaram um comportamento de fluxo reopético ou anti-tixotrópico, já que a curva descendente voltou acima da curva ascendente (SCHRAMM, 2006). O comportamento reológico dessas formulações revela que elas são dependentes de uma ação de cisalhamento para formar arranjos mais organizados. Entretanto, para o hidrogel de poloxamer + NaCl com ácido ursólico; hidrogel de poloxamer + NaCl com a DS_16 sem fármaco e hidrogel de poloxamer + NaCl com as DS_16 com fármaco, a curva descendente se sobrepõe à curva ascendente. Esse efeito é característico do comportamento tixotrópico desses hidrogéis mostrando que o tempo de aplicação do cisalhamento não interfere na recuperação da estrutura inicial dessas amostras (ISAAC *et al.*, 2008).

A tensão mínima necessária para o escoamento, assim como o índice de consistência (K) de todos os hidrogéis analisados mostraram valores superior na temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em relação aos estudos realizados a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Isso se deve ao fato de que à medida que ocorre o aumento da temperatura, mais grupos hidrofóbicos do poloxamer passam a ser desidratados e o número de agregados micelares que se empacotam é maior formando mais ligações cruzadas que explicam a maior resistência ao fluxo dessas formulações (KLOUDA, 2015).

Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento “*shear stress*” e taxa de cisalhamento “*shear rate*” a temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (A) e $37 \pm 0,0^\circ\text{C}$ (B). Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e símbolos vazios às curvas descendentes.

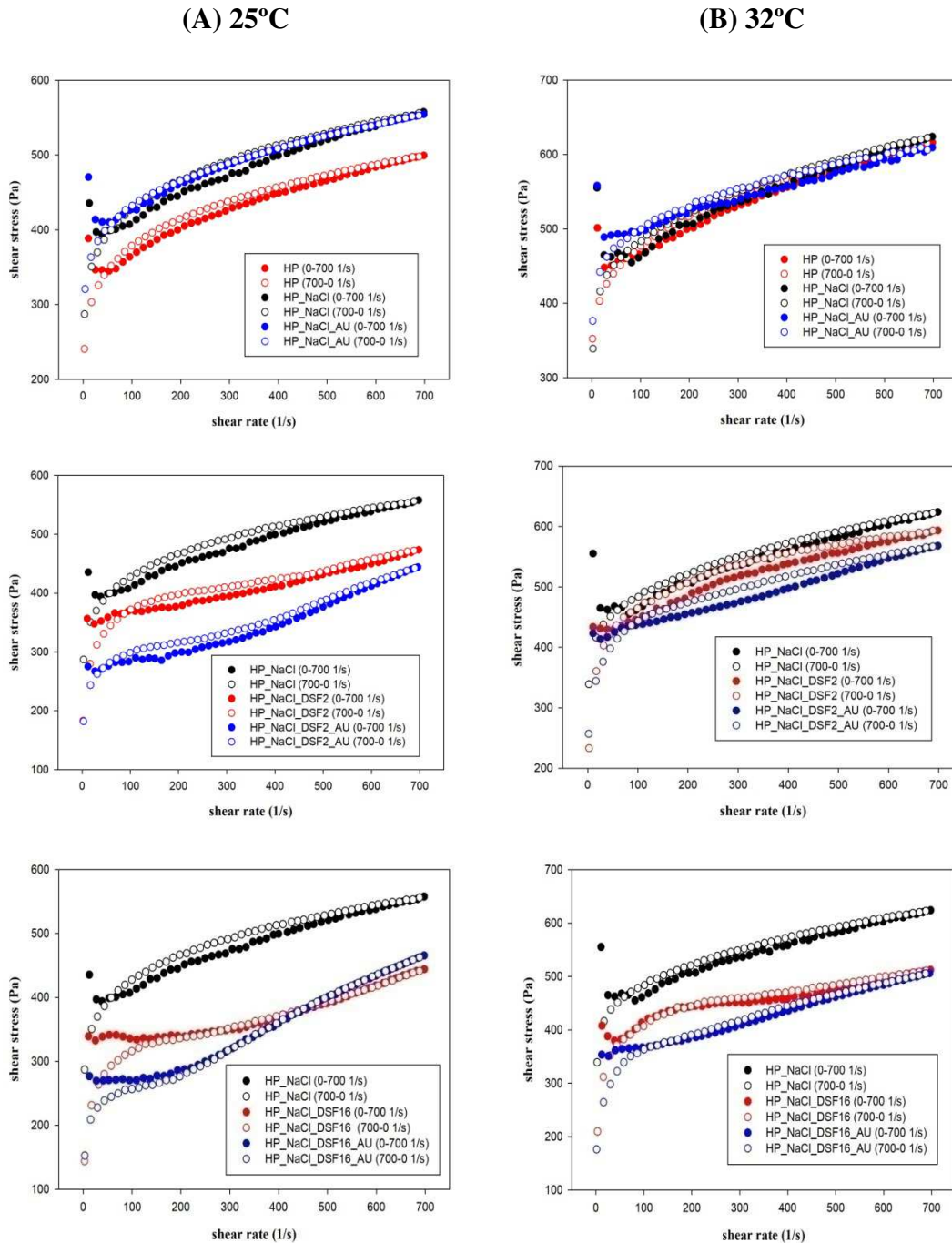


Tabela 16. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) e regressão linear (R) a temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

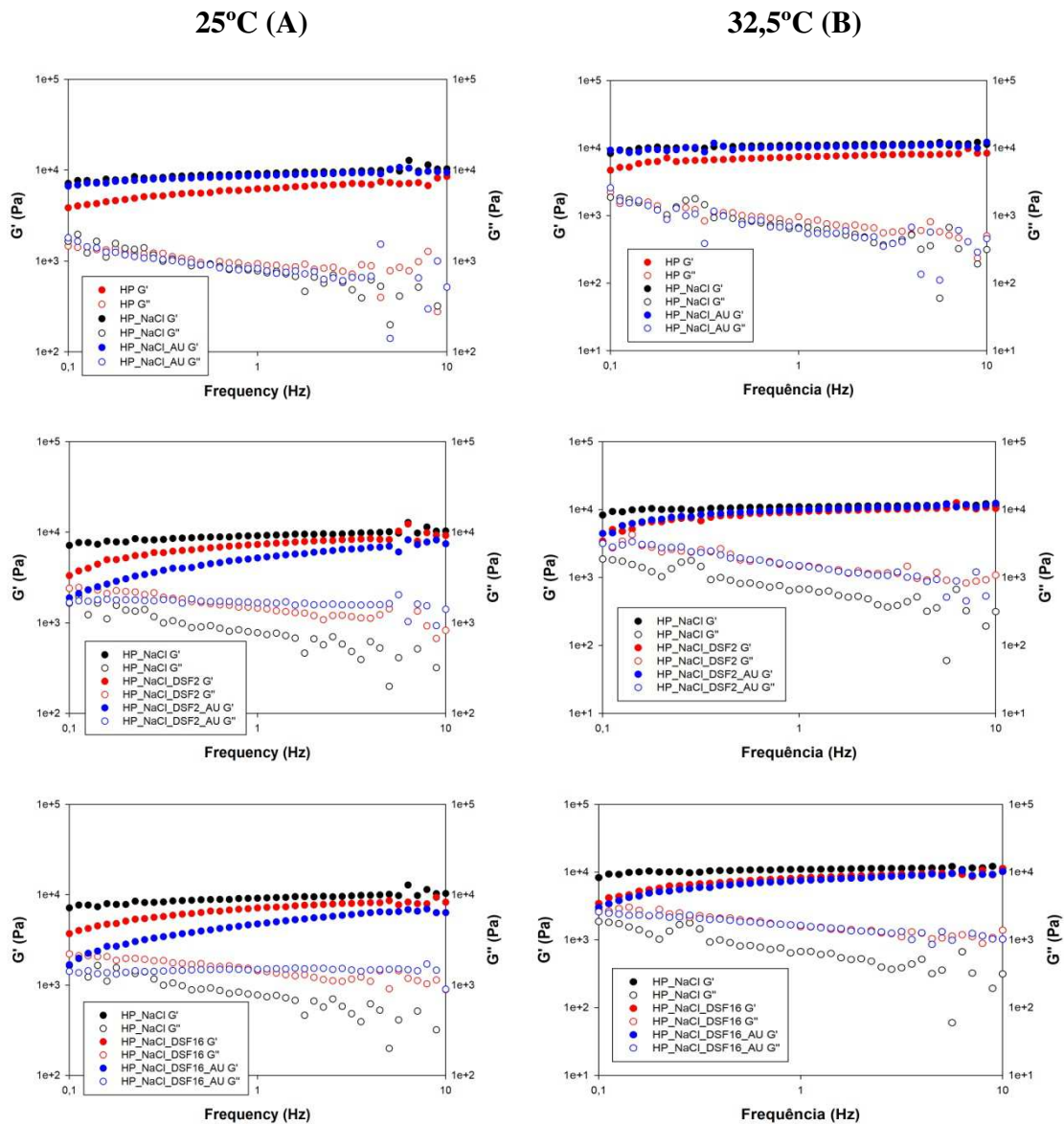
Formulações	25°C			32,5°C		
	n	K	R	n	K	R
HP	0,120	219,789	0,926	0,103	302,369	0,902
HP_NaCl	0,115	251,750	0,921	0,093	324,085	0,830
HP_NaCl_AU	0,096	286,923	0,893	0,061	389,349	0,812
HP_NaCl_DSF2	0,091	244,089	0,892	0,111	277,423	0,952
HP_NaCl_DSF2_AU	0,178	124,681	0,876	0,100	279,359	0,907
HP_NaCl_DSF16	0,087	227,135	0,772	0,081	289,566	0,936
HP_NaCl_DSF16_AU	0,229	95,014	0,885	0,126	209,288	0,906

5.7.4.2. Ensaio reológico oscilatório

Os ensaios oscilatórios determinam o comportamento viscoelástico das formulações submetendo-as a uma tensão de cisalhamento sinusoidal, podendo fornecer informações em relação à natureza estrutural (DUMORTIER *et al.*, 1991). Essas informações são obtidas com a análise do módulo de armazenamento (elástico) G' e do módulo de perda (viscoso) G'' . O G' corresponde tanto à energia que é armazenada no momento da deformação quando se tem um aumento da tensão, quanto à energia que é liberada quando a tensão cessa. No entanto, o G'' representa o material que não é capaz de armazenar energia, visto que a tensão aplicada é dissipada (perdida) na forma de deformação irreversível (PÈNZES *et al.* 2004).

A partir dos reogramas obtidos (Figura 30) verificou-se que todas as formulações submetidas à análise oscilatória tanto a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ quanto à temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ demonstraram predominantemente elásticas ($G' > G''$), em todo intervalo de frequência estudado. Esse comportamento é típico de formulações semi-sólidas e sugere que ambas apresentam estruturas altamente organizadas e possuem fortes interações entre as moléculas (YARIV *et al.*, 2010).

Figura 30. Reogramas de variação do módulo de armazenamento G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência.



De acordo com Saxena *et al.* (2011) os parâmetros S e n calculados por meio da Equação 6, a partir da lei da potência, são indicativos da densidade de reticulação no interior de um material. Dessa forma, quanto mais reticulada e forte se apresentar a estrutura de um material maior será o valor atribuído a S . No entanto, o valor de S é inversamente proporcional ao valor de n . Assim, valores altos de n indicam que material é formado por estruturas mais fracas.

Analisando a Tabela 18 foi possível verificar que os hidrogéis HP_NaCl e HP_NaCl_AU mostraram valores maiores de S e menores de n , em ambas as temperaturas

estudadas, demonstrando que a adição de NaCl e incorporação do fármaco nos hidrogéis de poloxamer contribuiu para formação de estruturas mais reticuladas e fortes. Além disso, as formulações incorporadas com as dispersões sólidas sem o fármaco (HP_DSF2 e HP_DSF16) revelaram valores maiores de S e menores de n ao contrário dos hidrogéis incorporados com as DS com fármaco, evidenciando que a adição das dispersões sólidas com fármaco resultou em estrutura menos reticuladas e organizadas. De maneira geral, os valores de S e ndos hidrogéis estão coerentes com os indicativos dos gráficos e com os valores de (G' e G'') exibidos na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de G' e G'' da análise oscilatória para os hidrogéis a temperatura de 25 ±0,5e 32 ±0,5°C.

Formulações	25 ±0,5°C		32 ±0,5°C	
	G'	G''	G'	G''
HP	6068,5	968,7	7244,8	901,0
HP_NaCl	9115,0	703,4	10779,8	807,3
HP_NaCl_AU	8620,1	841,1	10280,8	748,2
HP_NaCl_DSF2	7131,3	1429,3	8707,4	1749,0
HP_NaCl_DSF2_AU	5078,9	1648,0	9386,4	1681,0
HP_NaCl_DSF16	6768,2	1513,9	7793,8	1765,9
HP_NaCl_DSF16_AU	4641,4	1451,3	7191,7	1629,9

Tabela 18. Valores do expoente viscoelástico (n) resistência do gel (S) e da regressão linear (R) para as formulações estudadas.

Temperatura	25°C			32,5°C		
	Formulações	N	S	R ²	n	S
HP	0,129	5977,811	0,963	0,089	7192,613	0,919
HP_NaCl	0,077	9065,350	0,901	0,047	10758,350	0,895
HP_NaCl_AU	0,075	8576,567	0,941	0,044	10262,740	0,767
HP_NaCl_DSF2	0,167	6957,699	0,916	0,141	8559,029	0,903
HP_NaCl_DSF2_AU	0,237	4837,785	0,970	0,134	9239,716	0,918
HP_NaCl_DSF16	0,139	6655,485	0,940	0,151	7640,630	0,923
HP_NaCl_DSF16_AU	0,223	4448,514	0,966	0,177	6999,042	0,951

5.7.4.3. Determinação da temperatura de transição de fase sol-gel

A temperatura de transição de fase sol-gel pode ser modificada na presença de outras substâncias, como a adição de sais, fármacos e polímeros. Os valores de G' ao longo de uma rampa de temperaturas durante a transição sol-gel para hidrogel de poloxamer na concentração de 25% (p/v) na presença ou ausência de cloreto de sódio 0,9% (p/v) (NaCl), ácido

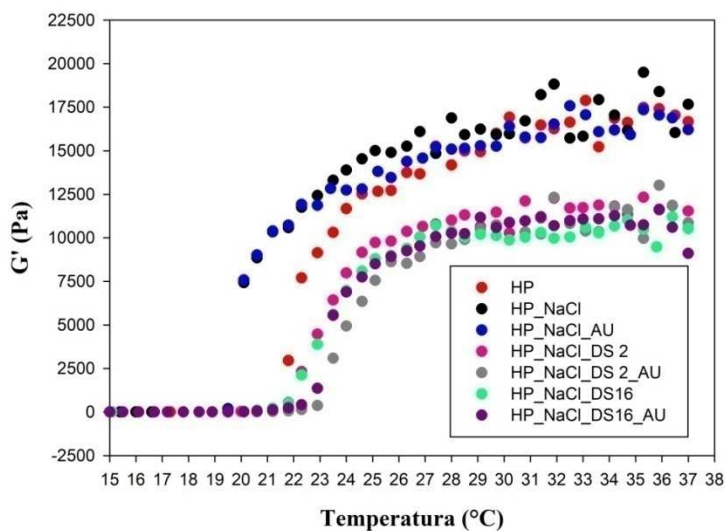
ursólico 0,3% (p/v) , dispersões F2 e F16 3% (p/v) com ou sem fármaco, são mostrados na Figura 31.

A temperatura de transição de fase sol-gel de hidrogéis de poloxamer consiste no ponto, em que o módulo de elasticidade (G'), está entre os valores para a solução e o gel. As propriedades reológicas da formulação são modificadas com o aumento da temperatura, assim antes do ponto de gelificação, o G' demonstra valores mais baixos e as amostras são caracterizadas como um líquido viscoso. Em seguida ocorre a fase correspondente ao processo de gelificação. E a partir de então, os valores de G' aumentam e as formulações tornam-se hidrogéis e passam a apresentar um comportamento predominantemente elástico. Por fim após a transição de fase de solução para gel, o módulo de elasticidade torna-se independente de temperatura (FREITAS et al., 2006).

A temperatura de transição sol-gel diminuiu 2°C com a adição de 0,9% (p/v) de NaCl e também com a presença do fármaco no hidrogel. Isto é atribuído ao fato de que o NaCl interfere na micelização do poloxamer e altera a desidratação do núcleo de poli óxido de propileno, uma vez que os íons de sódio interagem com oxigênio etéreo do polímero (DUMORTIER *et al.*, 2006).

Entretanto, a adição das DS com ou sem fármaco resultou no pequeno aumento da temperatura de transição de fase do hidrogel. Esse fenômeno pode estar relacionado com a modificação do empacotamento das micelas de poloxamer partículas e a algum nível de interação do hidrogel com o fármaco e polímeros presente nas dispersões.

Figura 31. Temperatura de transição de fase sol-gel dos hidrogéis obtidos com e sem fármaco e dispersões sólidas.



5.7.5. Análise do Perfil de Textura

Diversas técnicas podem ser empregadas para realizar medidas quantitativas do perfil de textura de um produto. As técnicas mecânicas são as mais utilizadas para caracterização de produtos farmacêuticos, pois permitem avaliar parâmetros, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão (TAI *et al.*, 2014).

Os valores de dureza e compressibilidade estão relacionados com a facilidade de administração da formulação no local desejado, sendo que a dureza indica a resistência do material a deformações e é verificada a partir da força máxima exercida pela sonda na primeira compressão (SENYIGIT *et al.*, 2011). A compressibilidade representa no trabalho (força x tempo) realizado para deformar o material durante a primeira compressão, sendo possível avaliar a habilidade de extrusão da formulação a partir do recipiente de embalagem e o grau de espalhabilidade das formulações na pele por meio desses parâmetros (CALIXTO *et al.*, 2015).

O parâmetro adesividade consiste no trabalho (área negativa) realizado para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda, com a qual a amostra entra em contato, sendo possível prever a capacidade das formulações em se aderir a uma determinada superfície (JONES, 1996). Por fim, a medida da coesão está relacionada com a recuperação estrutural da amostra após sofrer uma deformação. Esse parâmetro é avaliado por meio da razão entre a área resultante da segunda compressão pela área determinada na primeira compressão (EXPONENT LITE, 2009).

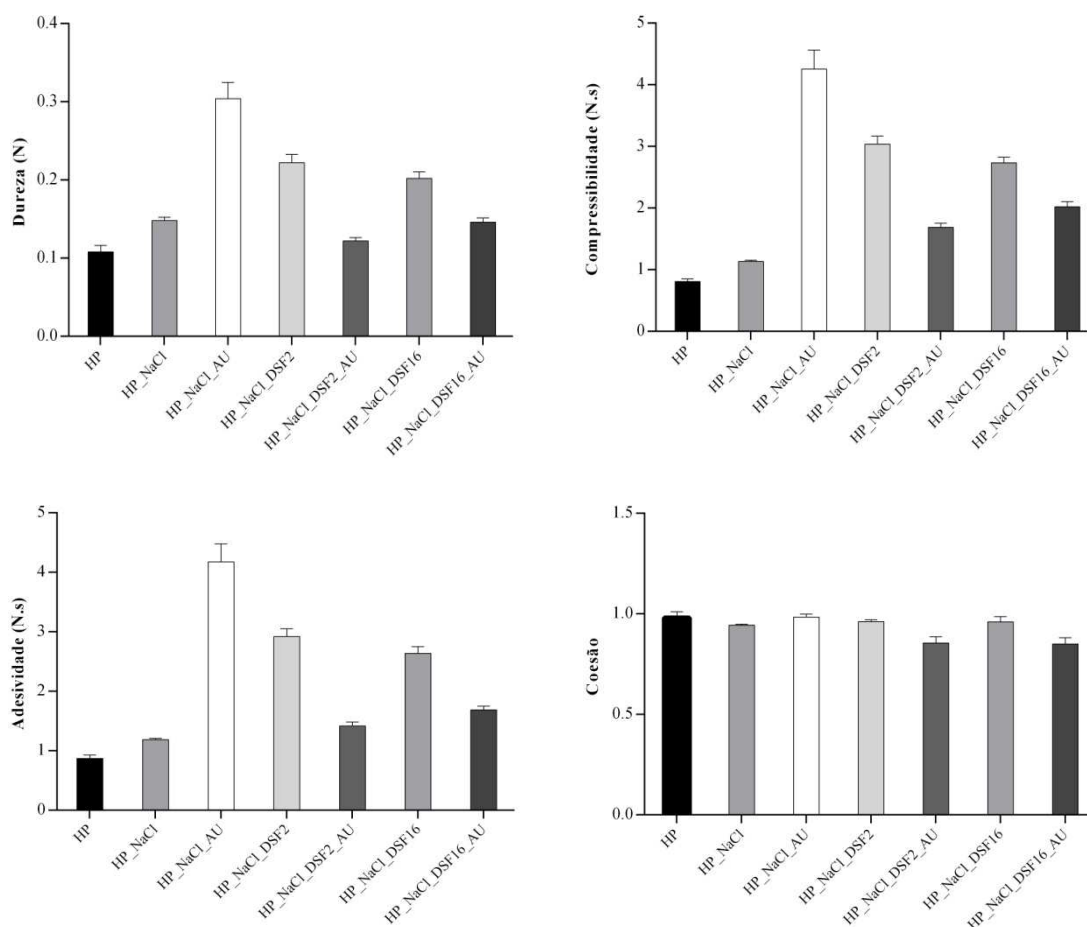
Dessa forma, a análise do perfil de textura dos hidrogéis obtidos é muito relevante, visto que permite verificar se os parâmetros mecânicos encontram-se adequados para administração cutânea, otimizando assim a aceitação pelo paciente (SENYIGIT *et al.*, 2011). Os parâmetros referentes aos perfis de textura obtidos para as amostras investigadas são apresentados nas Figuras 32.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que a adição de NaCl, bem como a incorporação do fármaco e das DS com e sem fármaco no hidrogel de poloxamer proporcionou um aumento significativo no valor dos parâmetros de dureza, compressibilidade e adesividade ($p < 0,05$). O aumento da resistência à deformação do hidrogel com a adição de NaCl também foi previamente constatado por YONG (2001). Além disso, a incorporação do fármaco resultou em um aumento no valor desses parâmetros em relação ao hidrogel de poloxamer, possivelmente devido a alguma interação química do fármaco com o polímero.

Os valores de dureza, compressibilidade e adesividade foram maiores para os hidrogéis contendo as DS sem fármaco do que para os hidrogéis contendo as DS com o fármaco. Esses resultados já eram esperados, visto que as DS sem o AU são previamente dispersas em solução aquosa de NaCl seguida da adição do poloxamer para formação do hidrogel. Dessa maneira, os grupos funcionais dos polímeros presentes nas DS estão mais disponíveis para interagir diretamente com o poloxamer. Enquanto que nas DS com o fármaco, grande parte dos grupos funcionais dos polímeros já está interagindo com o fármaco.

Os resultados revelaram que todos os hidrogéis analisados foram bastante coesos, ou seja, apresentaram ligações fortes entre as moléculas com uma posterior recuperação estrutural das formulações após a deformação (TAN et al., 2000).

Figura 32. Perfil de textura do hidrogel de poloxamer (HP) e HP adicionados de NaCl (HP_NaCl); HP_NaCl contendo as DS sem o fármaco (HP_NaCl_DSF2) e (HP_NaCl_DSF16); HP_NaCl com as DS com fármaco (HP_NaCl_DSF2_AU) e (HP_NaCl_DSF16_AU).



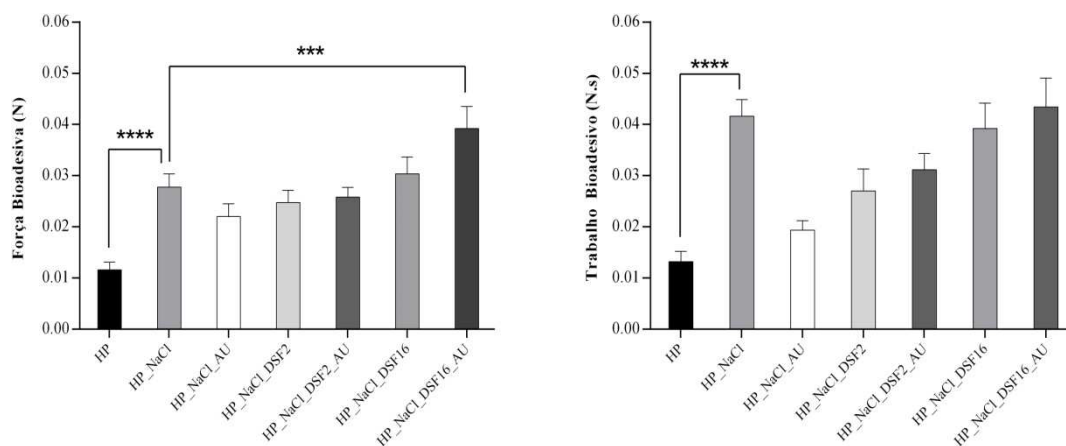
5.7.6. Estudo de Bioadesão *in vitro*

A adesão de formulações tópicas na pele é importante para a eficiência do tratamento tópico de doenças inflamatórias crônicas. Segundo Peppas e Buri (1985) o termo bioadesão consiste em um fenômeno interfacial que se difere da adesão convencional em função da consideração das propriedades características dos tecidos.

Conforme os dados apresentados (Figura 33) notou-se que os valores de força e de trabalho bioadesivo mostram-se significativamente menores para o hidrogel de poloxamer (HP) em relação as demais formulações, enfatizando que a inclusão de NaCl aumentou consideravelmente a interação do hidrogel com o tecido cutâneo.

Ademais, o hidrogel contendo a dispersão sólida 16 sem e com AU também apresentou maior capacidade bioadesiva em relação aos outros hidrogéis, sugerindo que presença de TPGS nas DS foi responsável por esse efeito bioadesivo acentuado, pois a natureza de superfície ativa dessa molécula proporciona melhor hidratação da pele, que tem demonstrado contribuir para a bioadesão (REPKA, 2001).

Figura 33. Força e trabalho máximo bioadesivo dos hidrogéis à temperatura de $32 \pm 0,5$ °C.



5.8. Estudo de Liberação *in vitro*

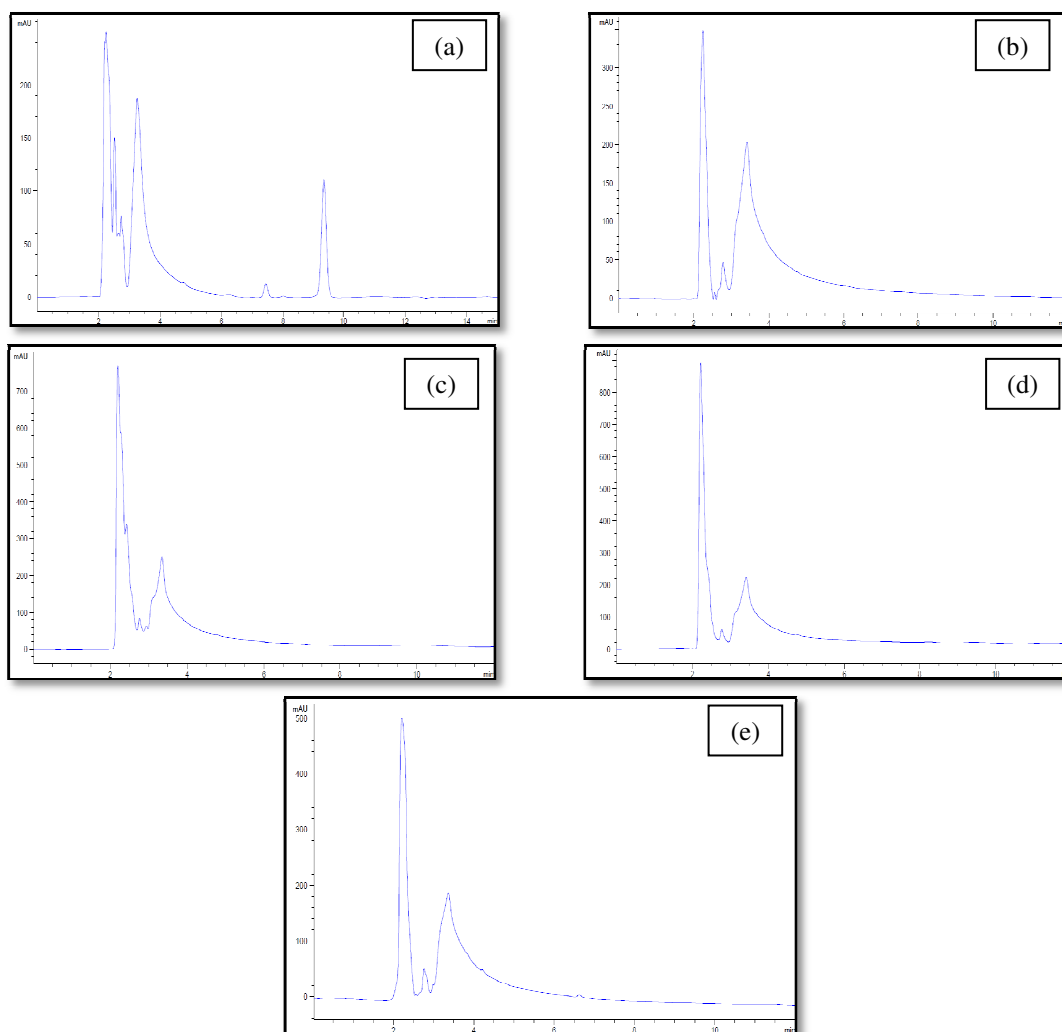
O estudo de liberação *in vitro* consiste em uma ferramenta importante no desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos, pois permite avaliar a velocidade e o mecanismo de liberação de uma substância ativa a partir de um veículo.

A seletividade e linearidade do ácido ursólico no meio receptor usado para o estudo de liberação foram avaliados.

5.8.1. Seletividade

Os cromatogramas apresentados na Figura 34(a-e) revelaram que as formulações sem o fármaco e a solução receptora não interferiu na análise quantitativa do ácido ursólico.

Figura 34. Cromatograma do AU em meio receptor (a); Cromatograma do meio receptor (b); Cromatograma da DSF2 sem fármaco (c); Cromatograma da DSF16 sem o fármaco (d) e Cromatograma do HP_NaCl sem fármaco (e).



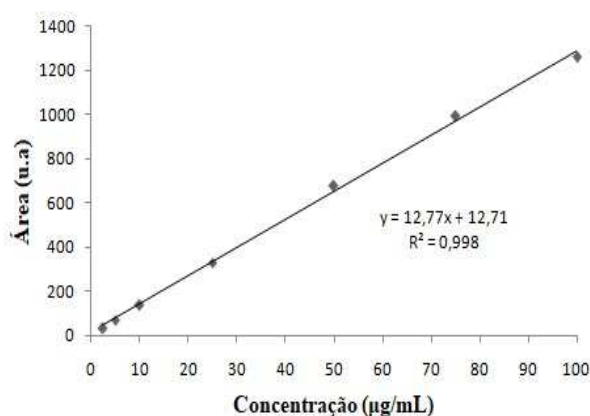
5.8.2. Linearidade

A partir da construção de três curvas de calibração o método utilizado demonstrou-se linear na faixa de 2,5 a 100 μ g/mL (Figura 34). Os dados obtidos a partir da análise de variância ANOVA (Tabela 19) confirmaram que a regressão linear foi significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e que não há diferença significativa entre as três curvas analíticas no intervalo de 95% de confiança ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) (PINTO, 2017).

Tabela 19. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de AU em meio receptor.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	845979,11	211494,78	2198,47	3,48
Regressão Linear	1	841287,46	841287,46	8745,13	4,96
Desvio da Linearidade	3	4691,65	1563,88	3,26	3,71
Dentro (resíduo)	10	962,01	96,20	-	-
Total	14	846941,12	-	-	-

Figura 35. Curva de calibração do ácido ursólico em meio receptor. Fase móvel: 90:10 (v/v) acetonitrila:solução de ácido acético 0,5 % (v/v) pH 3,5 ; Coluna: C18 (4,6 mm x 250mm; 5µm) fluxo: 1,0 mL/min.; λ: 203 nm; Injeção: 20µL; 28°C.



5.8.3. Estudo de solubilidade do fármaco em meio receptor

A solubilidade do AU (Tabela 20) em meio receptor foi investigada com o objetivo de garantir as condições *sink* no estudo de liberação *in vitro* conforme descrito no item 4.1. Após a centrifugação da amostra de ácido ursólico em condições acima da saturação em tampão fosfato de sódio 30 mM (pH = 7,4) + laril sulfato de sódio (1,25% p/v). O sobrenadante foi retirado e diluições foram realizadas para atingir a concentração de 25 µg/mL (dentro da faixa de linearidade). De acordo com os resultados obtidos a solubilidade média do AU em meio receptor foi igual a 2,28 mg/mL.

Tabela 20. Estudo de solubilidade do fármaco em meio receptor.

Concentração teórica (µg/mL)	Área	Concentração experimental (µg/mL)
25	161,70	11,67
25	153,20	11,00
25	165,40	11,96
Média	160,10	11,54
DP	6,12	0,49
DPR	3,82	4,24

5.8.4. Perfil de Liberação *in vitro* do ácido ursólico

Com o estudo do perfil de liberação do ácido ursólico a partir dos hidrogéis e dispersões sólidas, foi possível verificar a quantidade de fármaco liberada em função do tempo, bem como o mecanismo envolvido nesse processo.

Ao comparar o perfil de liberação do ácido ursólico livre e a partir das formulações verificou-se que todas as formulações avaliadas demonstraram umaumentonas taxas de liberação desse fármaco, uma vez que nenhuma quantidade de AU livre foi liberada durante 24 horas de ensaio, possivelmente devido às propriedades hidrofóbicas dessa molécula. Evidenciando a melhora da solubilidade do ácido ursólico nas DS e hidrogéis desenvolvidos.

A Tabela 21 demonstra que as taxas de liberação do AU a partir dasdispersões sólidas DS2_AU e DS16_AU não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si de acordo com os dados da análise estatística ($p < 0,05$) demonstrando que a adição de diferentes tensoativos (P407 e TPGS) não interferiu no perfil de liberação do fármaco nas DS. O mesmo foi observado para o hidrogel incorporado apenas com o fármaco (HP_AU) quando comparado com os hidrogéis que continham as dispersões sólidas (HP_DS2_AU) e (HP_DS16_AU), evidenciando que a presença das DS não influencia significativamente a liberação do AU a partir dos hidrogéis. No entanto, a velocidade de liberação do fármaco a partir das DS incorporadas nos hidrogéis foi mais lenta quando com comparada com liberação do mesmo a partir apenas das DS.

Figura 36. Perfil de liberação do ácido ursólico a partir de dispersões sólidas e hidrogéis após 24 horas de análises.

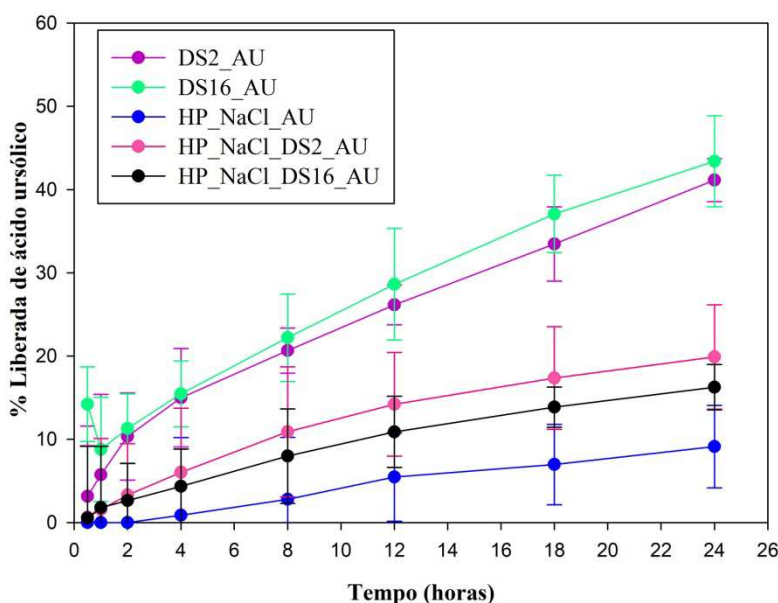


Tabela 21. Percentual de AU liberado a partir das formulações após 24 horas de ensaio.

Formulações	Liberação do ácido ursólico (%)
	24 horas
DS2_AU	41,13 ± 2,59 ^a
DS16_AU	43,39 ± 5,47 ^a
HP_NaCl_AU	9,12 ± 4,96 ^b
HP_NaCl_DS2_AU	19,90 ± 6,27 ^b
HP_NaCl_DS16_AU	16,25 ± 2,73 ^b

Símbolos iguais indicam valores médios sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Determinadas teorias e modelos matemáticos servem para descrever a cinética de liberação de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo de Weibull pode ser utilizado com sucesso em praticamente todos os tipos de curva de liberação. A equação (Equação 5) de Weibull indica a quantidade acumulada de fármaco em função do tempo e deve ser aplicada aos dados dos primeiros 63,2% de liberação do fármaco (COSTA; LOBO, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad (\text{Equação 5})$$

Na qual os valores de b estão relacionados com o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz de polímeros que constituem o sistema, visto que valores de $b \leq 0,75$ indicam que liberação ocorre por difusão Fickiana, ou seja, a matriz não controla a liberação do fármaco. O processo ocorre por difusão não Fickiana que está associada ao controle da liberação do fármaco pela matriz quando $0,75 < b < 1$ enquanto que valores de $b > 1$ indicam um mecanismo mais complexo de liberação que pode envolver simultaneamente, o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

O modelo proposto por Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER; PEPPAS, 1983) descreve exponencialmente a liberação do fármaco e consiste em uma combinação da difusão

do fármaco (Fickiana) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pela matriz) (RITGER; PEPPAS, 1987; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Os modelos matemáticos utilizados para avaliar o mecanismo de liberação do AU neste estudo foram os seguintes: Baker & Lonsdale; Peppas; Hixon & Crowell; Higuchi; Primeira Ordem e o de Weibull, conforme os dados da Tabela 22.

Tabela 22. Valores de R quadrado referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação *in vitro* do AU a partir das formulações obtidas.

Modelos matemáticos	Valores de R quadrado (R ²)				
	DS_2	DS_16	HP_AU	HP_DS2_AU	HP_DS16_AU
Baker & Lonsdale	0,9717	0,9256	0,7965	0,9424	0,9403
Korsmeyer-Peppas	0,9963	0,9312	0,9791	0,9866	0,9948
	n= 0,5928	n=0,4822	n=1,0731	n=0,6719	n=0,7049
Hixon & Crowell	0,9026	0,7073	0,9771	0,9286	0,9506
Higuchi	0,9826	0,9305	0,8005	0,9484	0,9458
Primeira Ordem	0,9198	0,7357	0,9769	0,9366	0,9557
	k=85,47	k= 59,57	k= 13,76	k = 23,30	k= 22,99
Weibull	0,9954	0,9867	0,9953	0,9997	0,9987
	b=0,7689	b=1,0324	b=1,0359	b= 0,9699	b= 0,9514

Com base nos valores do coeficiente de correlação (R²) verificou-se que o modelo matemático que melhor representou o perfil de liberação do ácido ursólico na maioria dos casos foi o de Weibull.

Como o valor de n demonstrou-se superior a 0,75 e inferior a 1 para as amostras HP_DS2_AU (0,9699) e HP_DS16_AU (0,9514) conclui-se que o mecanismo de liberação do fármaco a partir desses sistemas é modificada pela matriz dos polímeros. Entretanto os valores de b referentes à DS16 e o hidrogel incorporado com o AU (HP_AU) apresentaram-se acima de 1, sugerindo que o transporte do fármaco ocorreu por um mecanismo complexo que pode envolver simultaneamente o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero.

5.9. Experimentos de permeação cutânea *in vitro*

A quantidade cumulativa permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ácido ursólico a partir das dispersões sólidas selecionadas (DS2_AU e DS16_AU) e hidrogéis de poloxamer contendo essas dispersões (HP_DS2_AU) e (HP_DS16_AU) em função do tempo é mostrada na Figura 37.

Os resultados mostram uma diferença significativa ($p < 0,001$) da permeação do ácido ursólico a partir das dispersões sólidas em solução aquosa (3%, p/v) e a partir do hidrogel incorporado com as dispersões comparados a suspensão aquosa (3 mg/mL) do fármaco livre. Assim como foi observado anteriormente no estudo de liberação, nenhuma quantidade de AU foi encontrada no compartimento receptor no período de 30 horas de ensaio.

A dificuldade do ácido ursólico em permear a pele pode ser explicada pelas suas características altamente lipofílicas com valor de coeficiente de partição octanol/água (Log P) igual a 6,4 (Wiedersberg et al., 2014). Entretanto, a quantidade de AU acumulada permeada por unidade de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir das DS_2 foi de $245,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a para DS_16 foi igual a $342,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tais valores demonstram que as dispersões sólidas aumentaram significativamente a permeação cutânea do ácido ursólico.

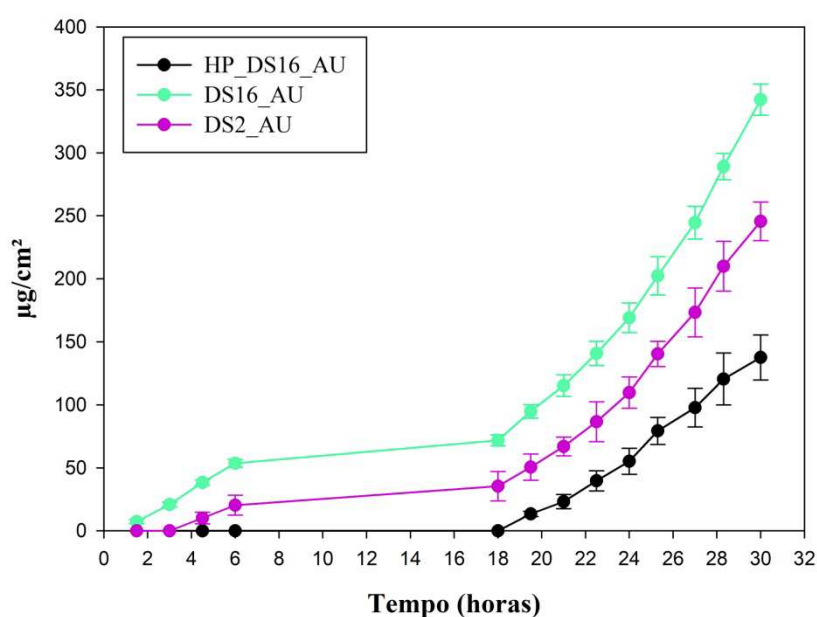
A dispersão sólida DS16_AU demonstrou uma quantidade acumulada de fármaco permeada ($342,24 \pm 12,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) significativamente ($p < 0,0001$) maior em relação à dispersão sólida DS2_AU ($245,58 \pm 35,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Este resultado pode ser atribuído à presença de D- α -tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) na DS16_AU, uma vez que este componente oferece propriedades interessantes como potencializador de penetração devido a sua estrutura anfifílica, constituída por cauda alquílica lipofílica de vitamina E e cabeça polar hidrofílica de polietilenoglicol 1000 com um valor de EHL igual a 13,2 (GUO et al.; 2013; WU, 1999). Em estudos prévios, a TPGS mostrou facilitar a difusão de fármaco através da pele devido à sua capacidade de modificar a estrutura da pele e tornar a barreira mais lipofílica, reduzindo a tensão interfacial (SHEU et al., 2003; SHEU; COLS, 2006; LIOU et al., 2009; SUPPASANSATORN et al., 2005).

O fármaco a partir do hidrogel contendo as dispersões sólidas DS2 demonstrou não permear a epiderme, visto que nenhuma quantidade de ácido ursólico foi detectada no compartimento receptor após 30 horas de experimento. Esse resultado não foi condizente com o perfil de liberação, possivelmente devido às diferentes propriedades da membrana biológica que dificultam a difusão do fármaco através da pele.

Na Figura 37, verificou-se que a DS16 quando incorporada no hidrogel (HP_DS16) mostrou controlar, de forma significativa ($p < 0,0003$), a permeação do ácido ursólico em

relação a DS16 isolada, como observado anteriormente nos ensaios de liberação *in vitro*. Esse fenômeno sugere que a viscosidade do sistema promoveu a difusão e o transporte mais lento do fármaco através da pele (WANG et al., 2016), uma vez que os hidrogéis são os mais viscosos que as dispersões sólidas isoladas em meio aquoso. Assim, a entrega de ácido ursólico na epiderme por um período prolongado pode ser desejável para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

Figura 37. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do ácido ursólico livre e a partir DS_2, DS_16 e HP_DS16 através da epiderme em 30 horas de estudo.



Os valores de fluxo do fármaco através da epiderme (J), o coeficiente de permeabilidade (Kp) e tempo de latência (Tl), obtidos a partir dos ensaios de permeação *in vitro* estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Parâmetros cinéticos obtidos da permeabilidade do ácido ursólico através da pele após a administração de DS_2, DS_16 e HG_DS2 e HG_DS16.

	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Kp (cm^2/s)	Tl (h)
UA	-	-	-
DS_2	17.34 ± 2.49^a	$1.60 \times 10^{-6} \pm 2.31 \times 10^{-7b}$	16.71 ± 0.31^d
DS_16	21.49 ± 0.84^a	$1.99 \times 10^{-6} \pm 7.75 \times 10^{-8b}$	15.17 ± 0.23^d
HP_SD16	12.48 ± 1.78^a	$1.16 \times 10^{-6} \pm 1.65 \times 10^{-7b}$	19.02 ± 0.59^d
HP_SD2	-	-	-

J: Fluxo através da pele; Kp: coeficiente de permeabilidade; Tl: tempo de latência. Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

Os valores de fluxo e coeficiente de permeabilidade que foram obtidos não apresentaram diferença estatística significativa entre as formulações testadas. Entretanto, foi observado o aumento no período de latência (h) e diminuição do fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) na seguinte ordem: DS16 incorporada no hidrogel (HP_DS16), dispersão sólida DS2 e dispersão sólida DS16.

5.10. Avaliação da penetração cutânea *in vitro*

Para entender o comportamento dessas formulações após a administração cutânea, o estudo da distribuição do ácido ursólico nas camadas da pele foi realizado utilizando a técnica de tape-stripping e avaliação da retenção cutânea.

A técnica de tape-stripping quando padronizada mostra-se adequada para determinar a dermatocinética de formulações tópicas, a partir dessa técnica a concentração do fármaco é determinada nas camadas de estrato córneo, as quais são progressivamente removidas pela remoção das fitas adesivas (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Os resultados do tape-stripping e do estudo de retenção na epiderme são mostrados na Figura 38. A quantidade encontrada de fármaco a partir das formulações nas camadas do estrato córneo demonstrou-se baixa ($< 50 \mu\text{g}$) em relação à massa de fármaco aplicada.

Os aparatos utilizados durante o ensaio da avaliação da penetração cutânea foram os seguintes: parafilme, papel alumínio, tampa de alumínio e algodão. Para garantir uma adequada recuperação do fármaco em relação a sua concentração no início de ensaio, qualquer resíduo de fármaco ou formulação dos aparatos foi extraído em acetotrilina separadamente. Para facilitar a interpretação dos dados, o gráfico representa a soma da quantidade de fármaco encontrada em cada um dos aparatos empregados no estudo.

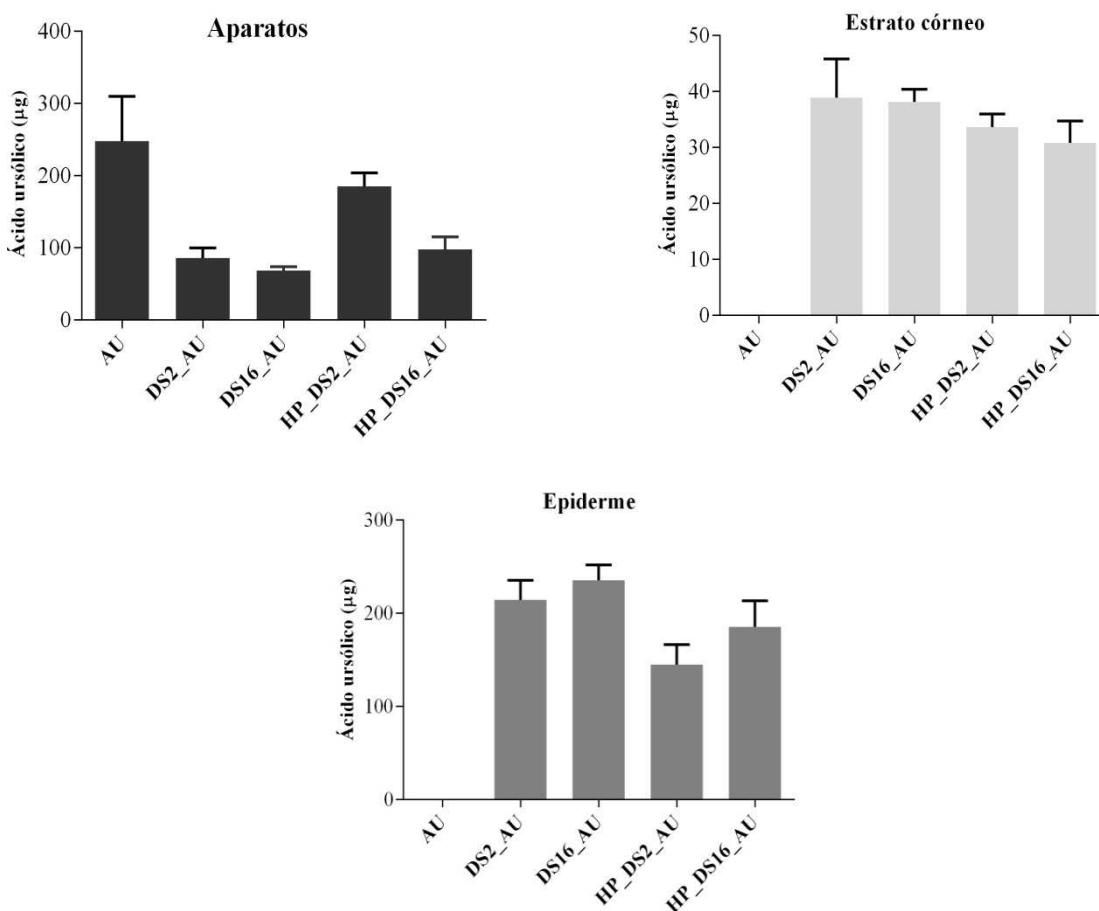
Conforme mostra a Figura 38, o AU livre apresentou uma maior quantidade de fármaco presente nos aparatos utilizados no estudo em relação as demais formulações. Apesar da DS2 mostrar um valor maior de fármaco no EC ($38,88 \mu\text{g}$), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos para DS2 e os valores apresentados para as demais formulações estudadas (DS16, HP_DS2 e HP_DS16).

O estudo de retenção do ácido ursólico em pele com espessura total foi realizado, com um tempo de aplicação de 4 horas. Comparando-se as diferentes formulações desenvolvidas, verificou-se que a retenção na epiderme foi máxima para DS16 ($235,32 \mu\text{g}$) e mínima para os

hidrogéis com DS2, HP_DS2 (144,80 μg) ($p < 0,01$). No entanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores encontrados para ambas das dispersões sólidas DS2 (214,31 μg) e DS16 (235,32 μg), além disso, a quantidade de fármaco retida a partir de HP_DS16 também não mostrou diferenças estatística significativa em relação aos valores obtidos para DS16.

De maneira geral, o AU a partir das formulações obtidas se acumulou mais na epiderme em comparação com o estrato córneo, isto é particularmente evidente no caso das DS16, em que a massa de fármaco na epiderme atinge 235,32 μg , enquanto a massa de fármaco no estrato córneo é da ordem de 38 μg .

Figura 38. Quantidade de fármaco recuperada (μg) nos aparatos, estrato córneo e epiderme após tape- stripping e estudo de retenção cutânea.



5.11. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer produto ou material de uso medicinal segundo o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993. Esse ensaio é de extrema

importância, visto que a citotoxicidade pode reduzir a eficácia de um produto e afetar diretamente o seu usuário.

O método de difusão em ágar fornece uma informação qualitativa por sobreposição indireta, e pode ser utilizado para investigar a citotoxicidade de materiais com diferentes constituições físicas, inclusive para produtos semi-sólidos.

De acordo com resultados obtidos, conforme a Tabela 24 verificou-se a ausência de halo de toxicidade ao redor dos discos para o controle negativo, enquanto que para o controle negativo (Triton-X) foi observado um halo com diâmetro médio igual a 1 cm evidenciando um grau moderado de citotoxicidade inerente ao material. Assim, os resultados de ambos os controle foram como esperado, revelando desempenho adequado do método.

Conforme a classificação padronizada fornecida pela Tabela 4, tanto as formulações testadas quanto o fármaco livre demonstram uma citotoxicidade branda. Embora o ácido ursólicotenha apresentado uma toxicidade branda, o mesmo apresentou um maior halo (0,475 cm) em relação as formulações. Em contraste, o hidrogel contendo a DS16 sem fármaco revelou um menor diâmetro de halo (0,333). A citotoxicidade das formulações sem e com o fármaco não foram significativamente distintas.

De maneira geral, o ácido ursólico bem com as formulaçõesdemonstraram-se biocompatíveis frente à linhagem celular L929 (fibroblasto derivados de camundongo). Assim, os hidrogéis desenvolvidos podem ser considerados seguros para administração cutânea.

Tabela 24. Medidas de extensão das áreas descoradas (halo).

Amostra	Medida do halo (cm)	Citotoxicidade
HP_DS2	0,425 ± 0,06	Branda
HP_DS2_AU	0,425 ± 0,06	Branda
HP_DS16	0,333 ± 0,05	Branda
HP_DS16_AU	0,392 ± 0,08	Branda
Ácido ursólico	0,475 ± 0,09	Branda
Controle negativo	0,000 ± 0,00	-
Controle positivo	1,000 ± 0,12	Moderada
Média ± DP		

5.12. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

O edema de orelha de induzido em camundongos é um modelo animal muito utilizado para a avaliação da atividade antiinflamatória tópica de medicamentos, pois é um experimento de baixo custo, rápido e simples de ser executado, além de fornecer resultados reprodutíveis (GÁBOR, 2003).

O óleo de cróton é um agente flogístico constituído por ésteres de forbol, dos quais o principal constituinte irritante e inflamatório é o 12-o-tetra-canoilforbol-13-acetato (TPA). O TPA consiste em um ativador da proteína quinase C e das quinases ativadas por mitógeno, as quais são responsáveis por estimular a liberação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a ativação da proteína 1 (AP-1), que são essenciais para ativação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), além de alguns outros mediadores, como a fosfolipase A2, fator ativador de plaquetas e ácido araquidônico (MURAKAWA et al., 2006).

Assim, esses mecanismos causam um processo inflamatório caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração de leucócitos, liberação de aminas vasoativas e de eicosanóides sintetizados pelas enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase (PINTO *et al.*, 2015; SARAIVA *et al.*, 2011). Dado que diversas vias inflamatórias são ativadas pelo óleo de cróton, os anti-inflamatórios com diferentes mecanismos de ação podem responder efetivamente a esse modelo.

A atividade anti-inflamatória tópica do ácido ursólico livre e partir das formulações obtidas foi avaliada em camundongos utilizando o modelo de edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton.

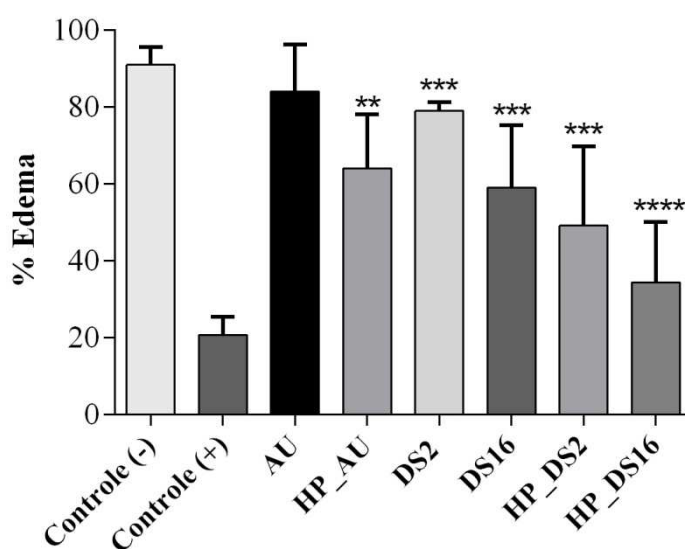
Neste estudo, observou-se que os animais que foram expostos ao óleo de cróton e não receberam tratamento demonstram um expressivo aumento no peso das orelhas do grupo controle negativo (91,06% de edema), indicando, como esperado, que um processo inflamatório foi desencadeado.

O ácido ursólico livre reduziu apenas 7% do edema, permanecendo ainda uma significativa inflamação na orelha dos animais. O ácido ursólico quando incorporado apenas no hidrogel de poloxamer já apresentou uma maior atividade anti-inflamatória significativa em relação ao fármaco livre, com a inibição de cerca de 30% do edema.

Como pode ser observado na figura 39, as duas formulações DS2 e DS16 mostraram uma atividade anti-inflamatória significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle negativo (animais que não receberam nenhum tratamento). Entretanto, o efeito anti-

inflamatório de DS2 e DSF16 foi significativamente melhorado quando ambas foram aplicadas incorporadas nos hidrogéis de poloxamer, com a capacidade de inibir 41, 87% e 56,64% do edema induzido por óleo de cróton. Assim, estes resultados indicam a vantagem do hidrogel de poloxamer como veículo para aumentar a eficácia das dispersões sólidas, provavelmente em função do seu aspecto semi-sólido e bioadesivo que aumenta o tempo de contato das formulações com a área inflamada.

Figura 39. Efeito anti-inflamatório tópico do ácido ursólico livre ou incorporado nas dispersões sólidas e/ou hidrogéis desenvolvidos em edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton.



6. CONCLUSÃO

- ❖ As dispersões sólidas desenvolvidas contribuíram para o aumento da solubilidade aquosa do ácido ursólico, especialmente com a utilização do poloxamer 407 como tensoativo;
- ❖ O método de evaporação do solvente demonstrou-se adequado para obtenção desses sistemas, visto que permitiu a conversão do fármaco do estado cristalino para o estado amorfo conforme evidenciado pelas análises de DRX e DSC;
- ❖ Os hidrogéis de poloxamer obtidos com a adição de NaCl e posterior incorporação do AU ou das DS com e sem o fármaco demonstraram propriedade mecânicas, bioadesivas e reológicas adequadas para administração cutânea;
- ❖ O perfil de liberação e permeação *in vitro* do ácido ursólico foi controlado pelas dispersões sólidas e os hidrogéis contendo as DS;
- ❖ O ácido ursólico se acumulou mais na epiderme do que no estrato córneo para todas as formulações desenvolvidas, especialmente no caso das DS16;
- ❖ O ácido ursólico bem com os hidrogéis com as dispersões sólidas demonstraram-se biocompatíveis frente à linhagem celular L929 (fibroblasto derivados de camundongo);
- ❖ O efeito anti-inflamatório das DS obtidas foi significativamente maior quando ambas foram aplicadas incorporadas nos hidrogéis de poloxamer, reduzindo 41,87% e 56,64% do edema induzido por aplicação tópico de óleo de cróton;
- ❖ De maneira geral os sistemas desenvolvidos demonstram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas de pele.

REFERÊNCIAS

- ABDULBAQI, I. M.; DARWIS, Y.; ASSI, R. A.; KHAN, N. A. K Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine : statistical optimization , characterization , and ex vivo evaluation. **Drug Design, Develop. and Therapy**, v. 10, p. 795–813, 2018.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; MEHTA, S. D. Preparation and Evaluation of Dermal Delivery System of Griseofulvin Containing Vitamin E-TPGS as Penetration Enhancer. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 67–74, 2012.
- ALLAN, S. H. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2012.
- ALVES, L. D. S.; DE LA ROCA SOARES, M. F.; DE ALBUQUERQUE, C. T.; DA SILVA, É. R. V.; VIEIRA, A. C. C.; FONTES, D. A. F.; FIGUEIRÊDO, C. B. M.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM, NETO, P. J. Solid dispersion of efavirenz in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 166–174, 2014.
- ANNEN, T.; EPPLE, M.A facile synthesis of dispersable NaCl nanocrystals. **Dalton Transactions**, p. 9731–9734, 2009.
- BAGHEL, S.; CATHCART, H.; REILLY, N. J. O. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization , Crystallization , Stabilization , Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2527–2544, 2016.
- BARICEVIC, D.; SOSA, S.; LOGGIA, D. R.; TUBARO, A.; SIMONOVSKA, B.;
- BARNES P. J. Transcription factors and inflammatory disease. **Hospital Practice (Off Ed)**, v. 31, p. 105–106, 1996.
- BARNES, P. J; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066–1071, 1997.
- BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 14, p. 101–114, 2001.
- BELTRANI, V. S. Suggestions regarding a more appropriate understanding of atopic dermatitis. **Current Opinion Allergy Clinical Immunology**, v. 5, p 413–418, 2005.
- BENSON, H. A. E. Elastic Liposomes for Topical and Transdermal Drug Delivery. **Methods in Molecular Biology**, v. 1522, p. 107–117, 2017.
- BHAGWAT, S. et al. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 472–479, 1999.
- BHISE, S. D. Ternary solid dispersions of fenofibrate with Poloxamer 188 and TPGS for enhancement of solubility and bioavailability. **Int J Res Pharm Biomed Sci**, v. 2, p. 583–595, 2011.

BOGMAN, K. et al. The role of surfactants in the reversal of active transport mediated by multidrug resistance proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p.1250–1261, 2003.

BOGUNIEWICZ, M. Atopic dermatitis: beyond the itch that rashes. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 25, p. 333-351, 2005.

BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, p. 1-29, 2015.

BORRÁS-BLASCO, J.; LOPEZ, A.; MORANT, M. J.; DÍEZ-SALES, O.; HERRÁZ-DOMÍNGUEZ, M.. Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 5, p. 15–22, 1997.

BRADY, J. et al. Polymer properties and characterization. In: YIHONG, Qiu (Editor). **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition**. Amsterdam: Academic Press, 2016. p. 181–223.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

BROWN, M. B.; MARTIN, G.P.; JONES, S. A.; AKOMEAH, F. K. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. **Drug Delivery**, v. 13, n. 3, p. 175-187, 2008.

BUCKLE, D. R. and HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2(8), p. 235-332, 1997.

BUHLER, V. Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals, Springer, 2005.

CALIXTO, G. et al. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, p. 490-496, 2015.

CARROLL, R. G. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 11-16.

CHANG, C. F; CHAU, Y. P; KUNG, H. N; LU, K. S. The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid–bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid–bovine serum albumin complex. **Inflammation Research**, v. 61, n. 2, p. 151-160, 2012.

CHANG, R. K.; RAW, A.; LIONBERGER, R.; YU, L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. **AAPS J**, v.15, p. 41-52, 2013.

CHAUDHARI, S. P., DUGAR, R. P. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p.68-77, 2017.

CHECKER, R.; SANDUR, S. K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R. S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B.; SAINIS, K. B. Potent anti-inflammatory

activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-15, 2012.

CHENG, S. Z. D. **Phase transitions in polymers**. Amsterdam: Elsevier, 2008.

CHEON KOO, L., TAKAHIRO, U., KAZAHOSA, K., AKIRA, Y., NAK-SEO, K., SHIGERU, G.J. Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 1994, v. 8, p 562–565.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. **Jouranal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 1281–1302, 1971.

CHOKSHI, R. J.; ZIA, H.; SANDHU, H.K.; SHAH, N.H.; MALICK, W.A. Improving the Dissolution Rate of Poorly Water Soluble Drug by Solid Dispersion and Solid Solution - Pros and Cons. **Drug Delivery**, v. 7544, 2007.

CHU, D. H. Overview of biology, development, and structure of skin. Development and Structure of Skin. Section 3. In: GOLDSMITH, L. A. et al. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 8. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008. v. 1, p. 57–92.

CIDES, L. C. S. et al. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **J. Therm. Anal. Cal.**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CRAIG, Q. M. D. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water soluble polymer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 231, n. 10, p. 131–144, 2002.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. Diffraction I: Geometry. In: Elements of X ray diffraction. 3. ed. Prentice Hall, 2002, p. 89 -122.

DA SILVA, F. D.; EESPERANDIM, V. R.; TOLDO, M. P. A.; SARAIVA, J.; CUNHA, W. R.; DE ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, 985–989, 2010.

DANIELS, R. Strategies for skin penetration enhancement. **Skin care Forum**, v.37, n.1, p. 50-55, 2004.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid dispersions: A review. **Pak J Pharm Sci**, v.22, p. 234-46, 2009.

DONG, X.; LIU, S.; ZHANG, L.; YU, S.; HUO, L.; QILE, M.; LIU, L.; YANG, B.; YU, J. Downregulation of miR-21 is Involved in Direct Actions of Ursolic Acid on the Heart: Implications for Cardiac Fibrosis and Hypertrophy. **Cardiovasc. Ther**, v. 33, n. 4, 161–167, 2015.

DONNELLY, R. F. Active Enhancement Methods in Transdermal Drug Delivery: Current Status and Future Perspectives. **Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin**, p. 359-366, 2017.

DUGAR, R. P.; GAJERA, B. Y.; DAVE, R. H. Fusion method for solubility and dissolution rate enhancement of ibuprofen using block copolymer poloxamer 407. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 6, p.1428-1440, 2016.

DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, 2006.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p 2709- 28, 2006

DUNCAN, C.; MIKE, R. Principles of Differential Scanning Calorimetry. In: (Ed.). **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.1-21. ISBN 978-0-8247-5814-1.

EERDENBRUGH, B. V.; SPEYBROECK, M. V.; MOLS, R.; HOUTHOOFD, K.; MARTENS, J. A.; FROYEN, L.; HUMBEECK, J. V.; AUGUSTIJNS, P.; MOOTER, G. V den. Itraconazole/TPGS/Aerosil®200 solid dispersions Characterization, physical stability and in vivo performance. **Eur J Pharm Sci**, v. 38, n.3, p. 270–278, 2009.

ELIAS, P. M.; MENON, G. K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. **Advances in lipid research**, v. 24, p. 1–26, 1991.

ELOY, J. O.; MARCHETTI, J. M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, n. 1, p 98–106, 2014.

ELOY, J. O.; OLIVEIRA, C. V.; MAROTTA-OLIVEIRA, S. S.; , SARAIVA, J e MARCHETTI, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, vol.35, n.5, pp.1036-1040, 2012.

ELOY, J. O.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J. M. Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; RODRÍGUEZ-CRUZ, I. M.; DOMÍNGUEZ-DELGADO, C.L.; DÍAZ-TORRES, R.; REVILLA-VÁZQUEZ, A. L.; CASAS ALÉNCATER, N. Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery, **Intech**, Chap. 8, 2012.

EXPONENT LITE Software: introduction to texture analysis. Version 4,5 [SI]: TA-XT Plus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of pharmacy**. 4th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

FONSECA-SANTOS, B.; SANTOS, A. M.; RODERO, C. F.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **Int J of Nanom**, v.11, p. 4553-4562, 2016.

FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LATROFA, A.; TULLIO, C.; PROVENZANO, M. R.; SERRA, M.; MUGGIRONI, M.; BIGGIO, G.; LISO, G. Dissolution properties and

anticonvulsant activity of phenytoin-polyethylene glycol 6000 and -polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1-2, p 63-73, 2001.

FREITAS, M.N.; FARAH, M.; BRETAS, R.E.S.; RICCI-JUNIOR, E.; MARCHETTI, J.M. Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 113–118, 2006.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear, In: WINYARD, P.G., WILLOUGHBY, D.A. (Eds.), **Inflammation Protocols**. Totowa, N J:Humana Press, 2003. p. 129-137.

GHEBREMESKEL, N.; VEMAVARPU, C.; LODAYA, M. Use of surfactant as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: stability testing of selected solid dispersions. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1928-1936, 2006.

GILHOTRA, R.; SAHADEVAN, J.; VIJAY, J.A basic insight into the stability and manufacturing aspects of solid dispersions. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, n. 2, p. 95–106, 2012.

GOLDMINZ, A. M.; AU, S.C.; KIM, N.; GOTTLIEB, A. B.; LIZZU, P.F. NF- κ B: An essential transcription factor in psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 69, p. 89–94, 2013.

GOSH, S.; HAYDEN, M. S. Celebrating 25 years of NF- κ B research. **Immunol Review**, v. 246, p. 5-13, 2012.

GOTTLIEB, A. B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of American Academy of Dermatology**. v. 53 , p. s3-16, 2005.

GUO, Y. et al. The applications of Vitamin e TPGS in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 175–186, 2013.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; SIORDIA-REYES, A. G.; MECKES-FISCHER, M.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. **Asian Pac. J. Trop. Med**, v. 9, n. 7, p. 644–651, 2016.

GUTTMAN-YASSKY, E. et al. Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 6, 2009.

GUY, R .H.; HADGRAFT, J. Structure-activity correlations in percutaneous absorption. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., Editor). **Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology- Drug Delivery**. New York, NY: Marcel Dekker, 1989. p. 95–109.

HAAF, F.; SANNER, A.; STRAUB, F. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses. **Polym. J**, v. 17, p. 142-153, 1985.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. In: FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D.T. (Editor). **The Biology of the Skin**. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000. p. 15-17.

HAN, T.; DAS, D. B. Potential of Combined Ultrasound and Microneedles for Enhanced Transdermal Drug Permeation: A Review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 312-328, 2015.

HANCOCK, B. C.; SHAMBLIN, S. L.; ZOGRAFI, G. Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below Their Glass Transition Temperatures. **Pharmaceutical Research**, v.12, n. 6, p. 799-806, 1995.

HILDEN, L. R.; MORRIS, K. R. Physics of amorphous solids. **J Pharm Sci**, v. 93, p.3-12, 2004.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Adv. Drug. Deliv Rev**, v. 54, p. 3-12, 2002.

HOMAYOUNI, A. et al. Preparation and characterization of celecoxib solid dispersions; comparison of poloxamer-188 and PVP-K30 as carriers. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 5, p. 322–331, 2014.

HUANG, K. et al. Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 2, p. 397–406, 2002.

HUANG, Y.; DAI, W. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014.

IBRAHIM, S. A. Spray-on transdermal drug delivery systems. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 12, n.2, p. 195-205, 2015.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

ISMAILOS, G.; PEPPAS, C.; MACHERAS, P. Enhancement of cyclosporine A solubility by D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). **Eur J Pharm Sci**, v.1, p. 269–271, 1994.

ISO 10993-5: 2009 Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (2009) Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (Accessed: 2nd April 2019).

ITA, K. ScienceDirect Transdermal delivery of vaccines - Recent progress and critical issues. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1080–1088, 2016.

JAMAL, M.; IMAM, S. S.; AQIL, M.; AMIR, M.; MIR, S. R.; MUJEEB, M. Transdermal potential and anti-arthritis efficacy of ursolic acid from niosomal gel systems. **Int. Immunopharmacol**, v. 29, n. 2, 2015.

JAMES, W. D.; BERGER, T. G.; ELSTON, D. M. **Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

JANSSENS, S.; MOOTER, G. VAN DEN. Review: physical chemistry of solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1571-1586, 2009.

JONES, D. S. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 49-58, 2009.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 12, p. 2229-2234, 1996.

JOSE, A.; MANDAPALLI, P. K.; VENUGANTI, V. V. K. Liposomal hydrogel formulation for transdermal delivery of pirofenidone. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 2, p. 139-147, 2015.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J. Control. Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.

KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R.H. Iontophoretic drug delivery, **Adv. Drug Deliv**, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-400, 2002.

KARATAŞ, A.; YÜKSEL, N.; BAYKARA, T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. **IL Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 777-782, 2005.

KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, n. 1, p. 338-349, 2015.

KOCHHAR, J. S. et al. Microneedle Integrated Transdermal Patch for Fast Onset and Sustained Delivery of Lidocaine. **Molecular pharmaceutics**, 2013.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

KOLAŠINAC, N. et al. Solubility enhancement of desloratadine by solid dispersion in poloxamers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 161-170, 2012.

KOMMAVARAPU, P. et al. Preparation and characterization of rilpivirine solid dispersions with the application of enhanced solubility and dissolution rate. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 71-79, 2015.

KONINGSVELD, R.; STOCKMAYER, W. H.; NIES, E. **Polymer phase diagrams**. Oxford: Oxford University Press, 2001.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25- 35, 1983.

KRAFT, S.; NOVAK, N.; KATOH, N.; BIEBER, T.; RUPEC, R. A. Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc(epsilon)RI on human monocytes and dendritic cells induces NF-kappaB activation. **J Invest Dermatol**, v. 118, p. 830–827, 2002.

KRASNA, A.; ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 125–132, 2001.

KRUEGER, J. G; BAWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annual Rheumatic diseases**, v. 64, p. 30-36, 2005.

KUMARA, P. et al. Physiochemical characterization and release rate studies of solid dispersions of Ketoconazole with Pluronic F127 and PVP K-30. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**.2011.

KUPPER, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues.Mechanisms and speculations.**J Clin Invest**, v. 86, p. 1783–1789, 1990.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHAEFER, U.F., BLUME-PEYTAVI, U.; TEICHMANN, A.; OTBERG t, N.; STERRY, W. Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery,**Skin Pharmacol. Physiol**, v.19, n.4, p. 232-236, 2006.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis.**Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 2003.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D.; NOMURA, I. HAMUD, Q. A.New insights into atopic dermatitis.**Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LEWINSKA, A.; ADAMCZYK-GROCHALA, J.; KWASNIEWICZ, E.; DEREGOWSKA, A.; WNUK, M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. **Apoptosis**.2017, v. 22, n.6, p.800–815, 2017.

LI, L.; ZHANG, X.; CUI, L.; WANG, L.; LIU, H.; JI, H.; DU, Y. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. **Brain Res**, v. 1497, p. 32–39, 2012.

LI, T.; CHEN, X.; LIU, Y.; FAN, L.; LIN, L.; XU, Y.; CHEN, S.; SHAO, J. pH-Sensitive mesoporous silica nanoparticles anticancer prodrugs for sustained release of ursolic acid and the enhanced anti-cancer efficacy for hepatocellular carcinoma cancer. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 96, p. 456–463, 2016.

LIN, D.; HUANG, Y.A thermal analysis method to predict the complete phase diagram of drug-polymer solid dispersions.**Int J Pharm**, v. 399, p. 109-115, 2010.

LIYOU, Y.B.; HO, H.O.; CHEN, S.Y.; SHEU, M. T. Correlation of the penetration enhancement with the influence of an alcohol/tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) cosolvent system on the molecular structure of the stratum corneum of nude mouse

skin as examined by microscopic FTIR/DSC. **Spectrochim. Acta Pt. A: Mol. Biomol. Spectrosc**, 2009 v. 74, p 695-703

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 92–94, 2005

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, n. 2, p. 57-68, 1995.

LOMBRY, C.; DUJARDIN, N.; PREAT, V. Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 32-37, 2000.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 41, n. 2, 2005.

LOPES, S. C. A; NOVAIS, M. V. M.; TEIXEIRA, C. S.; HONORATO-SAMPAIO, K. S.; PERREIRA, M.; FERREIRA, L. A. M.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, M. C. Preparation, physicochemical characterization, and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid. **Biomed Res. Int**, 2013.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 376-399, 2002.

MARSAC, P. J.; SHAMBLIN, S. L.; TAYLOR, L. S. Theoretical and practical approaches for prediction of drug-polymer miscibility and solubility. **Pharmaceutical Research**, v.23, p. 2417–2426, 2006.

MAS, J. D.; ZERMIANI, T.; THIESEN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; SILVA, K. ABS.; SOUZA, M. M.; MALHEIROS, A.; BRESOLIN, T. MB.; LUCINDA-SILVA, R. M. Nanoemulsion as a carrier to improve the topical anti-inflammatory activity of stem bark extract of *Rapanea ferruginea*. **Int. J. of Nanom**, p. 4495 - 4507, 2016.

MATSUMOTO, T, ZOGRAFI, G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl-acetate) in relation to indomethacin recrystallization. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1722–1728, 1999.

MAZZITELLI, S.; PAGANO, C.; GIUSEPPONI, D.; NASTRUZZI, C.; PERIOLI, L. Hydrogel blends with adjustable properties as patches for transdermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 47-57, 2013.

MCMILLAN, R. M., WALKER, R. H. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. **Trends Pharmacological Sciences**, v.13, n. 8, p. 323-330, 1992.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394–397, 1997.

MICELI, N.; TAVIANO, M. F.; GIUFFRIDA, D.; TROVATO, A. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. **J. Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 261-266, 2005.

MILLER, M. A., PISANI, E. The cost of unsafe injections. **Bull World Health Organ**, v.77, p. 808–811, 1999.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. **Trends Biotechnol**, v. 18, n. 10, p. 412-420, 2000.

MOHD, C.; NAVEED, A.; NADIA, H.; ISHAK, A. Synthesis and characterization of thermo- and-pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. **Carbohydr Polym**, v. 88, p. 465–73, 2012.

MONEGHINI, M. et al. Characterization of solid dispersions of itraconazole and vitamin e TPGS prepared by microwave technology. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 237–246, 2010.

MOREAU, R. A.; WHITHAKER, B. D.; HICKES, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, p 457–500, 2002.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemistry Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.

MURPHY, G. F. Histology of the skin. In: ELDER, D.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; JOHNSON JR., B. **Lever's histopathology of the skin**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

NAHAK, P.; KARMAKAR, G.; CHETTRI, P.; ROY, B.; GUHA, P.; BESRA, S. E.; SOREN, A.; BYKOV, A. G.; AKENTIEV, A. V.; NOSKOV, B. A. Influence of lipid core material on physicochemical characteristics of an ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier: An attempt to enhance anticancer activity. **Langmuir**, v. 32, n. 38, p. 9816–9825, 2016.

NAIK, A. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NAJID, A.; SIMON, A.; COOK, J.; CHABLE-RABINOVITCH, H. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. **FEBS Letters**, v. 299, 213 – 217, 1992.

NASCIMENTO, P.; LEMOS, T.; BIZERRA, A.; ARRIAGA, Â.; FERREIRA, D.; SANTIAGO, G.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. **Molecules**, v.19, n. 1, p. 1317–1327, 2014.

NICKOLOFF, B. J., NESTLÉ, F. O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, v.13, p. 1664-1675, 2004.

NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRAFT, S. Immunoglobulin E-bearing antigenpresenting cells in atopic dermatitis. **Current Allergy Asthma Reports**, v. 4, p. 263–269, 2004.

OTTO, W.; DRAHOSLAV, L. Hydrophilic gels in biologic use. **Nature**, v.185, p.117-118, 1960.

OVESNA, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVA, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 131-7, 2006.

PALMER, B. C.; DELOUISE, L. A. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. **Molecules**, v.17, p. 1-17, 2016.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARENTE, M. E. et al. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 511–518, 2015.

PARK, E. S. et al. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, n. 1–2, p. 109–119, 2000.

PASSERINI, N., ALBERTINI, B., PERISSUTI, B., RODRIGUEZ, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, n. 1–2, p. 92–102, 2006.

PASTORE, M. N. et al. Transdermal patches : history , development and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, 2015.

PATIL, H.; TIWARI, R.; REPKA, M. Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation. **AAPS PharmSciTech**, 2015.

PATIL, P. H.; BELGAMWAR, V. S.; PATIL, P. R. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble raloxifene using microwave induced fusion method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 571–578, 2013.

PÉNZES, T.; CSÓKA, I.; EROS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. **Rheologica Acta**, v. 43, n. 5, p. 457–463, 2004.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulation. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, p. 27–46, 2000.

PEPPAS, N. A.; Preface, in: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals*, v. 1, **CRC Press**, 1986.

PEREIRA, G. G.; DIMER, F. A. and GUTERRES, S. S. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p.1121-1125, 2013.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química**: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: Ed. UFSCar, 2017.

PINTO, I. C; CERQUEIRA-COUTINHO, C; FREITAS, Z. M. F; DOS SANTOS, E. P; CARMO, F. A; RICCI JUNIOR, E. Development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) to determine ethyl butylacetylaminopropionate in topical repellent formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. 1–8, 2017.

- PINTO, N. D. C. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; GAMEIRO, J.; MOREIRA CHEDIER, L.; CASTANÕN, M. C. M. N.; SCIO, E., 2015. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337.
- POTLURI, R. H. K. et al. Solubility enhancement and physicochemical characterization of carvedilol solid dispersion with Gelucire 50/13. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 1, p. 51-57, 2011.
- PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2009.
- PRISTA, L. N. Administração de Medicamentos. Tecnologia Farmacêutica I Volume. 7ª Edição. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 63-99, 2008.
- PUND, S.; JOSHI, A.; VASU, K.; NIVSARKAR, M.; SHISHOO, C. Gastroretentive delivery of rifampicin: *In vitro* mucoadhesion and *in vivo* gamma scintigraphy. **Int. J. Pharm.** (2008), doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.048.
- RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chem Biol Interact**, v. 176, n. 2-3, p. 99-107, 2008.
- RAMYA DEVI, D.; SANDHYA, P.; VEDHA HARIA, B. N. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy **J. Pharm. Sci. & Res**, vol. 5, n. 8, p. 159-165, 2013.
- RATHI, S. K.; D'SOUZA, P. Rational and ethical use of topical corticosteroids based on safety and efficacy. **Indian Journal of Dermatology**, v. 57, n. 4, p. 251-259, 2012.
- RAVIN, H. A.; SELIGMAN, A. M.; FINE, J. Polyvinyl pyrrolidone as a plasma expander; studies on its excretion, distribution and metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 24, p. 921-929, 1952.
- REPKA, M. A.; MCGINITY, J.W. Influence of vitamin E TPGS on properties of hydrophilic films produced by hot melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, p.63-70, 2000.
- REPKA, M.; BATTU, S.; UPADHYE, S. Pharmaceutical application of hot-melt extrusion: part II. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 33, p. 1043-1057, 2007.
- RITGER, P.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 37- 42, 1987.
- RODERO, C. F.; CALIXTO, G. M. F.; SANTOS, K. C.; SATO, M. R.; RAMOS, M. A. S.; MIRÓ, M. S.; RODRÍGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E.; CHORILLI, M. Curcumin-loaded liquid-crystalline systems for controlled drug release and improved treatment of vulvovaginal candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, P. 1-42, 2018.
- ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5th ed. London, UK: American Pharmaceutical Association, 2005.

RUSSEL-JONES, R.; POWELL, A. M.; ACLAND, K.; CALONJE, E.; O'DOHERTY, M.; HEALY, C. The chances of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **European Journal of Surgery Oncology**, v.31, p.210-211, 2005.

RYU, S. Y, OAK, M. H.; YOON, S. K.; CHO, D. I.; YOO, G. S. Anti-allergic and antiinflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. **PlantaMed**, v. 66, p. 358–360, 2000.

SAMPAIO, S. A. P; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**. 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 2000.p. 1-5.

SAMPATH, S. *et al.* X-ray diffraction study of nanocrystalline and amorphous structure within major and minor ampullate dragline spider silks. **Soft Matter**, v. 8, n. 25, p. 6713–6722, Jul 2012. ISSN 1744-6848. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569461> >.

SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R., COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I .R. A. Topical antiinflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **J. Ethnopharmacol.** v.136, n.3, p. 504-510, 2011.

SAVIC, S. *et al.* An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, n. 1, p. 182–191, 2011.

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263–270, 2011.

SCHMOLKA, I. R. Artificial Skin I .Preparation and Properties Treatment of Burns. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 6, p. 571–582, 1972.

SCHOELLHAMMER, C.M.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Skin Permeabilization for Transdermal Drug Delivery: Recent Advances and Future Prospects. **Drug Delivery**, v. 11, p. 393–407, 2014.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SEELEY, R. R., STEPHENS, T. D., TATE, P. A **Base Química da Vida. Anatomia & Fisiologia**. 6ª ed. Loures: Lusociência, 2003.p. 28-54.

ŞENYİİT, T. *et al.* Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 123–129, 2011.

SERAJUDDIN, A. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 1058-1066, 1999.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.272, n.1-2, p. 1-10, 2004.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Crit Rev Ther Drug**, v.20, n.2-3, p.215-247, 2003.

SHAPIRO, Y. E. Structure and dynamics of hydrogels and organogels: an NMR spectroscopy approach. **Prog Polym Sci**, v. 36, p. 1184–253, 2011.

SHARMA, A.; JAIN, C. Solid dispersion: a promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 149-179, 2011.

SHAZLY, G. A.; IBRAHIM, M. A.; BADRAN, M. M and ZOHEIR, K. M. A. Utilizing Pluronic F-127 and Gelucire 50/13 Solid Dispersions for Enhanced Skin Delivery of Flufenamic Acid. **Drug Development Research**, p. 1-9, 2012.

SHEU, M.T.; CHEN, S.Y.; CHEN, L.C.; HO, H.O. Influence of micelle solubilization by tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) on solubility enhancement and percutaneous penetration of estradiol. **Journal of Controlled Releases**, v. 88, p 355-368, 2003.

SHEU, M.T.; WU, A.B.; LIN, K.P.; SHEN, C.H.; HO, H.O. Effect of tocopheryl polyethylene glycol succinate on the percutaneous penetration of minoxidil from water/ethanol/polyethylene glycol 400 solutions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p 595-607, 2006.

SHIN, S. C.; SHIN, E. Y.; CHO, C. W. Enhancing effects of fatty acids on piroxicam permeation through rat skins. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 563–566, 2000.

SLOAN, K. B.; DEVARAJAN-KETHA, H.; WASDO, S. C. Dermal and transdermal delivery: prodrugs. **Ther Deliv**. v. 2, n.1, p. 83-105, 2011.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

STUDY, A. F. The junctions of normal human epidermis. A freeze-fracture study. **Journal of Ultrastructured Research**. v. 61, p. 44–61, 1977.

SUBBARAMAIAH, K.; MICHALUART, P.; SPORN, M. B.; DANNENBERG, A. J., Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 2399 –2404, 2000

SUH, H.; SHIN, J.; KIM, Y.-C. Microneedle patches for vaccine delivery. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 42, 2014.

SUH, N.; HONDA, T.; FINLAY, H. J.; BARCHOWSKY, A.; WILLIAMS, C.; BENOIT, N. E. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v. 58, n.4, p. 717–723, 1998.

SUPPASANSATORN, P.; DU, L.; CONWAY, B.R.; WANG, Y.; NIMMANNIT, U. Delivery of temozolomide hexyl ester prodrug through skin from VE TPGS microemulsion systems. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 57, 2005.

TAKATS, Z.; VEKEY, K.; HEGEDUS, L. Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v. 15, n. 10, p. 805-810, 2001.

TAN, Y. T.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, O. Effect of Carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. *AAPS PharmSciTech*, v. 1, n. 3, p. E24, 2000.

TSURUTA D. NF-kappa B links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, v. 3, p. 40-48, 2009.

US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.0. Jan, 2009. Available from, as of Feb 4, 2009: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>

VAN DE GRAFF, K. M. *Anatomia Humana*. Barueri: Manole, 2003.

VANBEVER, R.; LEROY, M. A.; PREAT, V. Transdermal permeation of neutral molecules by skin electroporation. *Journal of Controlled Release*, v. 54, n. 3, p. 243-250, 1998.

VARGAS DE OLIVEIRA, E. C.; CARNEIRO, Z. A.; DE ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J. M. Development and Evaluation of a Nanoemulsion Containing Ursolic Acid: a Promising Trypanocidal Agent. *AAPS Pharm Sci Tech*, v. 11, p. 9-12, 2003.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery*, v. 12, p. 1068-1075, 2007.

VICTORELLI, F. D. et al. Metronidazole-loaded polyethyleneimine and chitosan-based liquid crystalline system for treatment of staphylococcal skin infections. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 14, n. 1, p. 227-237, 2018.

VO, C.L.; PARK, C.; LEE, B. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European J. of Pharm and Biopharm*, v.85, n.3, p. 799-813, 2013.

WALTERS, K. A. Surfactants and percutaneous absorption. In: Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J. (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurements, Modelling*. *Ibc Technical services*, p 148-162, 1989.

WALTERS, K.A. *Dermatological and Transdermal Formulations*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002. *Structure of Skin*: p. 57-92.

WANG Y. L.; WANG, Z. J.; SHEN, H. L.; YIN, M.; TANG, K. X. Effects of artesunate and ursolic acid on hyperlipidemia and its complications in rabbit. *Eur. J. Pharm. Sci*, v. 50, p. 366-371, 2013.

WANG, L.; WANG, G. L.; LIU, J. H.; LI, D.; ZHU, D. Z.; WU, L. N. Effects of ursolic acid in ameliorating insulin resistance in liver of KKAY mice via peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *J. Chinese Integr. Med.*, v. 10, n. 7, p. 793-799, 2012.

WANG, M. *et al.* Ursolic acid liposomes with chitosan modification: Promising antitumor drug delivery and efficacy. *Materials Science and Engineering C*, v. 71, p. 1231-1240, 2017.

WANG, W. Y. et al. Enhanced transdermal permeability via constructing the porous structure of poloxamer-based hydrogel. **Polymers**, v. 8, n. 11, 2016.

WANG, W. Y.; HUI, P. C. L.; WAT, E.; NG, F. S. N.; KAN, C-W.; LAU, C. B. S.; LEUNG, P-C. Enhanced transdermal permeability via constructing the porous structure of poloxamer-based hydrogel. **Polymers**, v. 8, n. 11, 2016b.

WANG, W.; ELAINE, W.; PATRICK, C. L.; HUIL, B. C., FRENCY, S. F. N.; CHI-WAI, K.; XIAOWEN, W.; HUAWEN, H.; ERIC, C.W.W.; CLARA, B. S. L.; PING-CHUNG, L.. Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

WEGIEL, L. A. et al. Crystallization of amorphous solid dispersions of resveratrol during preparation and storage-Impact of different polymers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 171–184, 2013.

WEINSTEIN, G. D.; MCCULLOUGH, J. L.; ROSS, P. A. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. **Journal of Investigation Dermatology**, v. 85, p. 579–83, 1985.

WILLIAMS, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice**. London: Pharmaceutical Press, 2003. p. 1-242.

WILLIAMS, I. R. and KUPPER, T. S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMS, P. A. **Handbook of Industrial Water Soluble Polymers**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2008.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 57Y73.

WOZNIAK, Ł.; SKASPKA, S.; MARSZALEK, K. Ursolic Acid — A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities Ursolic Acid — A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**, v. 20, p. 20614–20641, 2015.

WU, S. H., HOPKINS, W. K. Characteristics of D-alpha-tocopheryl PEG1000 succinate for applications as an absorption enhancer in drug delivery systems. **Pharmaceutical Technology**, v. 23, p. 52-68, 1999.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 185–192, 2010.

YONG, C. S. et al. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, n. 1–2, p. 195–205, 2001.

YUAN, T.; QIN, L.; WANG, Z.; NIE, J.; GUO, Z.; LI, G.; WU, C.; . Solid lipid dispersion of calcitriol with enhanced dissolution and stability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 8, p. 39-47, 2013.

ZHAI, X. et al. Preparation and characterisation of solid dispersions of tanshinone IIA, cryptotanshinone and total tanshinones. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 85–97, 2017.

ZHANG, Y.; SONG, C.; LI, H.; HOU, J.; LI, D. Ursolic acid prevents augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in high-fat diet-induced obese rats by restoring down regulated spinal PPAR α . **Molecular Medicine Reports**.p. 5309–5316, 2016.

ZHANG, Z.; TAN, S.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4889–4906, 2012.

ZHOU, Z. et al. Synthesis, characterization and thermal analysis of ursolic acid solid forms. **Crystal Research and Technology**, v. 50, n. 7, p. 538–548, 2015.