

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO α -BISABOOL
E AVALIAÇÃO DAS SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
GASTROPROTETORA**

Thatiana Ferreira Terroso

Porto Alegre, 2014

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO α -BISABOLOL
E AVALIAÇÃO DAS SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
GASTROPROTETORA**

Tese apresentada por **Thatiana Ferreira Terroso**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 03 de novembro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Márcia Wink

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dra. Marilise Burger

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Terroso, Thatiana Ferreira

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO alfa-BISABOLOL E AVALIAÇÃO DAS SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES CITOTÓXICA E GASTROPROTETORA / Thatiana Ferreira

Terroso. -- 2014.

169 f.

Orientadora: Silvia Staniçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. alfa-bisabolol. 2. nanocápsulas poliméricas. 3. carreadores lipídicos nanoestruturados. I. Guterres, Silvia Staniçuaski, orient. II. Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios 405 (FacFar-UFRGS) e K204 (IQ-UFRGS), os quais disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.

*À minha avó,
Nair,
Aos meus pais,
Mário e Clarinda,
Aos meus irmãos,
Thayse e Thales,
E ao meu marido,
Pedro.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sílvia, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade concedida de trabalhar ao seu lado durante os anos de iniciação científica, mestrado e doutorado. Pela orientação, paciência e sobretudo pelos ensinamentos compartilhados.

À Profa. Adriana Pohlmann e ao Prof. Ruy Beck pela oportunidade de colaboração e pelas contribuições no decorrer deste trabalho.

Aos amigos do laboratório 405 e k204 que ao longo desses anos tornaram o dia-a-dia sempre agradável, seja pelas conversas, discussões científicas ou ajuda na realização de experimentos.

Em especial, aos colegas que participaram de forma mais direta neste trabalho ou me permitiram participar dos seus projetos - Greice de Oliveira Ferreira, Kelly Bueno Condotta, Francisco Noé da Fonseca, Karina Paese e Ana Carolina Asbahr.

À querida amiga e colega Denise Jornada pelo seu entusiasmo contagiante, pelas discussões científicas e pela sempre disponibilidade em ajudar nos experimentos.

À Faculdade de Farmácia e ao PPGCF, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À UFRGS pela oportunidade de realizar meus estudos da graduação ao doutorado.

Às minhas queridas colegas e amigas Amanda Frasson, Amanda Barden, Maiara Pigatto, Andrea Pereira e Marcella Oliveira, pelos maravilhosos momentos compartilhados durante a graduação, o mestrado e o doutorado.

Aos meus amigos de infância, pelos encontros quase semanais, pelas conversas, pela convivência, carinho, e por ilustrarem perfeitamente a palavra amizade.

Aos meus pais, Mário e Clarinda, pela formação que me propiciaram, pela paciência e carinho. Sobretudo pelo constante incentivo e por terem me apoiado em todas as decisões.

Aos meus irmãos e avó, Thayse, Thales e Nair, pelo carinho, apoio e amizade.

Ao Pedro, pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência, ajuda, pelas discussões científicas e por me fazer muito feliz! À sua família pelo carinho, paciência e acolhida.

RESUMO

O presente trabalho tem como proposta central o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas contendo α -bisabolol. Considerando que o α -bisabolol é um óleo, ele é proposto como substância a ser encapsulada, constituindo, simultaneamente, em parte ou todo o núcleo oleoso das nanocápsulas em três diferentes concentrações (1, 10 e 16 mg/mL). Adicionalmente, o α -bisabolol também é utilizado para a preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados, apresentando-se desta forma como componente estrutural, além de constituir a substância carregada em duas concentrações (10 e 16 mg/mL). Determinou-se os perfis de liberação de α -bisabolol a partir das formulações nanotecnológicas, analisando as possíveis variações em função da modificação das proporções de α -bisabolol e triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TCM). Foi verificado que uma maior concentração de TCM nas formulações está relacionada a um maior controle de liberação. De acordo com avaliação por calorimetria exploratória diferencial, pode-se sugerir que haja uma interação entre o α -bisabolol e o TCM. Após avaliação da permeação cutânea a partir dos dois tipos diferentes carreadores (com concentração de 10 mg/mL de α -bisabolol), pode-se observar que as nanocápsulas poliméricas possibilitaram maior acúmulo de α -bisabolol na epiderme, enquanto os carreadores lipídicos reteram-no no estrato córneo. Na avaliação da concentração de α -bisabolol na derme, os resultados indicaram um maior controle de permeação a partir de ambos nanocarreadores quando comparados à emulsão do óleo. A avaliação do efeito citotóxico e captação celular em células de melanoma evidenciou que as nanocápsulas contendo α -bisabolol apresentaram maior efeito citotóxico em comparação ao óleo livre devido a vetorização promovida para o interior celular. Ainda, a nanoencapsulação do α -bisabolol acarretou em um aumento da sua atividade gastroprotetora *in vivo*, para ambas as nanoestruturas, frente a úlceras induzidas por etanol e indometacina.

Palavras-chave: nanocápsulas poliméricas, carreadores lipídicos nanoestruturados, α -bisabolol.

ABSTRACT

This work mainly propose the development of nanotechnological based formulations containing α -bisabolol. Considering that α -bisabolol is an oil, it is proposed as a substance to be encapsulated, forming simultaneously the totality or part of nanocapsules oily core in different concentrations (1, 10 and 16 mg/ml). Additionally, α -bisabolol is also proposed for the preparation of nanostructured lipid carriers, thus presenting itself as a structural component and the substance to be carried (10 and 16 mg/ml). The release profiles of α -bisabolol from nanotechnological formulations were studied analyzing the possible variations due to the change in proportions of α -bisabolol and caprylic capric acid triglycerides. It was found that the presence of increased lipid content in the formulations is related to a greater release control. The differential scanning calorimetry evaluation suggested that there is an interaction between the two oils, α -bisabolol and caprylic capric acid triglycerides. After a skin permeation evaluation of the two different carriers (α -bisabolol concentration of 10 mg/ml), it was possible to observe that the polymeric nanocapsules allowed greater accumulation of α -bisabolol in the epidermis, while lipid carriers retained the oil in the stratum corneum. In assessing the concentration of α -bisabolol in the dermis, the results indicated greater permeation control from both nanocarriers compared to emulsified oil. The cytotoxic effect and cellular uptake evaluation in melanoma cells showed that nanocapsules containing α -bisabolol presented greater cytotoxic effect than free oil due to nanocapsule vectorization to the cell interior. In addition, nanoencapsulation of α -bisabolol caused an increase in its gastroprotective activity, for both nanostructures, in ethanol and indomethacin-induced ulcers.

Keywords: polymeric nanocapsules, nanostructured lipid carriers, α -bisabolol.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura molecular do α -bisabolol.....38

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser das formulações de nanocápsulas.....65

Figura 1.2. Perfis de liberação *in vitro* do α -bisabolol não nanoveiculado a partir de diferentes formulações.....68

Figura 1.3 Perfis de liberação *in vitro* a partir das formulações de nanocápsulas contendo α -bisabolol.....70

Figura 1.4. Resultado de ultracentrifugação em presença de gradiente de densidade (Percoll®)74

Figura 1.5. Análise de DSC para avaliação da interação entre α -bisabolol e triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico.....75

Figura 1.6. Efeito do α -bisabolol livre (α -BDMSO) e nanoencapsulado (α -BNC16) sobre a viabilidade celular da linhagem celular de glioma.....78

Figura 1.7. Efeito do α -bisabolol livre (α -BDMSO) e nanoencapsulado (α -BNC1) sobre a viabilidade celular da linhagem celular de glioma.....79

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser, das formulações.....86
- Figura 2.2. Perfis de liberação *in vitro* do α -bisabolol a partir das formulações de nanocarreadores lipídicos.....89
- Figura 2.3. Perfis de liberação *in vitro* do α -bisabolol a partir das formulações (α -BCT10 e α -BNC10) em comparação com a emulsão (α -Bemulsão).....91
- Figura 2.4. Perfis de liberação *in vitro* do α -bisabolol a partir das formulações (α -BCT16 e α -BNC16) em comparação com a emulsão (α -Bemulsão).....92
- Figura 2.5. Classificação do grau de irritação das formulações.....93
- Figura 2.6. Permeação *in vitro* do α -bisabolol a partir das formulações: α -Bemulsão e α -BNC10.....94
- Figura 2.7. Permeação *in vitro* do α -bisabolol a partir das formulações: α -Bemulsão e α -BCT10.....96
- Figura 2.8. Efeito do α -bisabolol livre (α -BDMSO) e nanoencapsulado (α -BNC10) sobre a viabilidade celular da linhagem celular de melanoma (SK-MEL-28).....99
- Figura 2.9. Avaliação da captação celular de nanocápsulas contendo α -bisabolol, com polímero ligado a rodamina B, a partir de células de melanoma (SK-MEL-28).....101

Figura 2.10. Avaliação da captação celular de nanocápsulas contendo α -bisabolol, com polímero ligado a rodamina B, a partir de células de melanoma (SK-MEL-28) através de citometria de fluxo.....103

CAPÍTULO 3

Figure 1. Gastroprotective effect of formulations on ethanol-induced ulcer.....122

Figure 2. Visual stomach evaluation.....123

Figure 3. Gastroprotective effect of formulations on indomethacin-induced ulcer.124

Figure 4. Rat gastric mucosal surface epithelial cells by scanning electron microscope after the ethanol-induced gastric ulcer.....126

Figure 5. Rat gastric mucosal surface epithelial cells by scanning electron microscope after the indomethacin-induced gastric ulcer.....127

Figure 6. Histological evaluations of formulations on ethanol (EtOH) induced gastric lesions in rats (Hematoxylin and Eosin (1) and PAS (2), average increase).....129

Figure 7. Histological evaluations of formulations on indomethacin induced gastric lesions in rats (Hematoxylin and Eosin (1) and PAS (2), average increase).....131

Figure 8. α -bisabolol retention, in nanoparticle formulations (α -BNC, α -BCT) and emulsion (α -B-Emulsion), over stomach porcine mucosal subjected to washing.....133

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1.	Composição da formulação de nanocápsula polimérica branca (NC branca).....	51
Tabela 2.	Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 1 mg/mL (α -BNC1).....	51
Tabela 3.	Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL (α -BNC10).....	52
Tabela 4.	Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL (α -BNC16).....	52
Tabela 5.	Composição da formulação de nanopartícula lipídica branca (CT branca).....	53
Tabela 6.	Composição da formulação de nanopartícula lipídica contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL (α -BCT10).....	54
Tabela 7.	Composição da formulação de nanopartícula lipídica contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL (α -BCT16).....	54
Tabela 8.	Classificação do grau de irritação de acordo com o potencial irritante.	59

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1. Diâmetro médio das partículas (D[4,3]) e distribuição granulométrica (span) medidos pela técnica de difratometria de laser.	64
Tabela 1.2. Diâmetro de partículas e índice de polidispersão (espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta e número de partículas das formulações.....	66
Tabela 1.3. pH, viscosidade e teor das formulações.....	66
Tabela 1.4. Valores de constante de velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h).....	69
Tabela 1.5. Valores de constante de velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h)	72

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Diâmetro médio das partículas (D[4,3]) e distribuição granulométrica (span) medidos pela técnica de difratometria de laser.....	85
Tabela 2.2. Diâmetro e índice de polidispersão (espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta e número de partículas.....	87
Tabela 2.3. Valores de pH, viscosidade e teor.....	87
Tabela 2.4. Valores de constante de velocidade de liberação k (min^{-1}) e tempos de meia vida $t_{1/2}$ (h).....	89
Tabela 2.5. Valores de média de PE-A obtidos através de citometria de fluxo, em função do aumento da concentração.....	103

CAPÍTULO 3

Table 1.	Particle size by laser diffraction.....	119
Table 2.	Particle size by dynamic light scattering.....	120
Table 3.	Physicochemical characterization of formulations.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

α -BCT10 - carreadores lipídicos nanoestruturados contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL

α -BCT16 - carreadores lipídicos nanoestruturados contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL

α -BNC1 - nanocápsulas contendo α -bisabolol na concentração de 1 mg/mL

α -BNC10 - nanocápsulas contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL

α -BNC16 - nanocápsulas contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL

α -BNC10-RB - nanocápsulas contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL em que 10% da poli(ϵ -caprolactona) foi substituída por poli(ϵ -caprolactona) ligada covalentemente a rodamina B

α -BNE16 - nanoemulsão de α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL

AINEs - anti-inflamatórios não-esteróides

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

BHE – barreira hemato-encefálica

CAM – membrana córioalantóide

CAT – catalase

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CT Branca – Carreador lipídico nanoestruturado branco

D[4,3] – diâmetro médio baseado no volume

DMEM - meio de cultivo celular de Eagles modificado por Dulbecco

DMSO - dimetilsulfóxido

DSC – calorimetria exploratória diferencial

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FBS – soro fetal bovino

GPx – glutationa peroxidase

IC₅₀ – dose responsável pela redução de 50% da viabilidade

INF - interferon

LD₅₀ – dose responsável pela letalidade de 50% dos animais testados

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MS – monoestearato de sorbitano

MTT - brometo de ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio])

Mw – massa molecular ponderal

NC Branca - nanocápsula branca

NE16- nanoemulsão de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico na concentração de 16 mg/mL

NO – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato-salino

PCL - polímero poli (ε-caprolactona)

PDI - Índice de polidispersão

PEG - Polietilenoglicol

SNC – Sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

Span – Amplitude de distribuição de tamanho das partículas

TCM – Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico

5-LOX - 5-lipoxigenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVO	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1. Nanotecnologia	31
3.1.1. Nanobiotecnologia	31
3.1.2. Sistemas carreadores de fármacos	31
3.1.3. Nanopartículas poliméricas	32
3.1.4. Nanopartículas lipídicas	36
3.2. α -bisabolol	37
3.2.1. α -bisabolol para tratamento de gliomas	39
3.2.2. α -bisabolol para tratamento de melanoma	42
3.2.3. α -bisabolol para prevenção de úlceras gástricas	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Matérias-primas	49
4.2. Equipamentos	49
4.3. Metodologia	50
4.3.1. Preparação das nanocápsulas	50
4.3.2. Preparação das nanopartículas lipídicas	53
4.3.3. Caracterização físico-química das formulações	54
4.3.4. Estudo de gradiente de densidade	57
4.3.5. Calorimetria exploratória diferencial	57
4.3.6. Estudo de liberação <i>in vitro</i>	58
4.3.7. Avaliação do potencial irritante	58
4.3.8. Estudo de permeação cutânea	59
4.3.9. Manutenção das linhagens celulares	60
4.3.10. Exposição	60
4.3.11. Avaliação da viabilidade celular	61
4.3.12. Avaliação da captação celular	62
4.3.13. Gerenciamento de resíduos	62

CAPÍTULO 1	63
1.1. Objetivo	63
1.1.1. Objetivos específicos	63
1.2. Resultados e Discussão.....	64
1.3. Conclusão	79
CAPÍTULO 2	83
2.1. Objetivo	83
2.1.1. Objetivos específicos	83
2.2. Resultados e Discussão.....	84
2.3. Conclusão	104
CAPÍTULO 3	109
3.1. Objetivo	109
3.1.1. Objetivos específicos	109
3.2. Artigo científico.....	110
5. CONCLUSÕES FINAIS	145
6. PERSPECTIVAS	149
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, a utilização da nanotecnologia nas áreas médica e farmacêutica têm sido amplamente estudada. Em destaque, encontra-se o estudo e desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos. Estes sistemas promissores apresentam vantagens frente às preparações farmacêuticas convencionais, como a diminuição de efeitos-adversos (Kumari *et al.*, 2010; Vilos and Velasquez, 2012), o aumento da biodisponibilidade do fármaco (Cruz *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012) e, ainda, a possibilidade de direcionamento do efeito farmacológico ao tecido-alvo (Elsheikh *et al.*, 2012; Bernardi *et al.*, 2009). A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada à sua concentração no sítio de ação, desta forma, a utilização de sistemas nanocarreadores é uma alternativa, visando o controle da liberação do fármaco e de sua distribuição seletiva no organismo (Couvreur *et al.*, 2002). A liberação controlada de fármacos é uma importante ferramenta empregada em formas farmacêuticas inovadoras através da nanotecnologia, possibilitando que mesmo com um menor regime de administrações (Fontana *et al.*, 2011) obtenha-se o aumento da eficácia (Bernardi *et al.*, 2009).

Carreadores coloidais de fármacos como lipossomas, complexos lipídicos, nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas, apresentam-se como veículos promissores para administração de fármacos lipofílicos pelas vias intravenosa (Ahmed *et al.*, 2008; Couvreur *et al.*, 2002), oral (Frezza *et al.*, 2010; Bowman & Leong, 2006), cutânea (Alvarez-Róman *et al.*, 2001) e oftálmica (Katzer *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2004). As nanocápsulas poliméricas são amplamente empregadas no desenvolvimento de formulações que controlam a liberação de fármacos, uma vez que seus constituintes, a parede polimérica e o núcleo oleoso atuam, de forma combinada, na modulação da liberação das substâncias veiculadas (Fontana *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Hoffmeister *et al.*, 2012). Estas formulações têm destaque ainda por apresentarem comportamento reservatório, controlando a liberação do fármaco para posterior absorção (Cattani *et al.*, 2010). As nanocápsulas poliméricas podem também exercer proteção ao trato gastrintestinal frente à ação de substâncias agressivas, como etanol e

anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Guterres *et al.*, 2001; Bernardi *et al.*, 2009) através de proteção mecânica e de um aumento na concentração do fármaco no sítio-alvo (Haas *et al.*, 2009; Frozza *et al.*, 2010).

Por sua vez, a utilização de nanopartículas lipídicas e carreadores lipídicos nanoestruturados para o controle da liberação de fármacos surgiu como uma alternativa tecnológica. Em sua preparação são utilizados lipídios biocompatíveis, sem a necessidade do emprego de solventes orgânicos (menor risco de toxicidade), apresentando ainda facilidade na transposição de escala, pois podem ser produzidas empregando equipamentos comerciais como homogeneizadores de alta pressão (Zur Mülen *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2007; Guterres *et al.*, 2007).

O α -bisabolol é um álcool sesquiterpeno oleoso com massa molecular de 222,37 Da, isolado do óleo essencial de uma variedade de plantas, arbustos e árvores, o qual apresenta diversas potencialidades biológicas. O óleo essencial de *Matricaria chamomilla*, por exemplo, contém até 50% de α -bisabolol sendo esta molécula considerada o principal componente que contribui para o efeito anti-inflamatório da camomila (Jakovlev *et al.*, 1969, 1979). Estudos revelaram que o α -bisabolol também tem um potente efeito citotóxico tempo- e dose-dependente sobre linhagens celulares malignas de gliomas de ratos e humanos, induzindo a apoptose através da via mitocondrial, sem demonstrar efeitos tóxicos nas células normais (Cavaliere *et al.*, 2004). Estudos anteriores ainda descrevem que a administração oral de α -bisabolol é capaz de proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol (Rocha *et al.*, 2010).

Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, carreadores lipídicos nanoestruturados empregando a manteiga de cacau como lipídio sólido apresentaram efeito gastroprotetor contra úlceras induzidas por etanol. Os resultados desse estudo indicaram que as estas nanopartículas são capazes de formar um filme sobre a mucosa gástrica, conferindo uma proteção mecânica contra o efeito do etanol administrado oralmente (Bueno *et al.*, 2013). Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa foi detectada uma nova abordagem para o tratamento de gliomas baseada na administração da indometacina nanoencapsulada em nanocápsulas

poliméricas. Os resultados evidenciaram que nanocápsulas de indometacina podem ser consideradas para o tratamento de gliomas, sendo mais efetivas que o fármaco em solução (Bernardi *et al.*, 2008).

A partir do exposto, o presente trabalho tem como proposta central o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas contendo α -bisabolol. Considerando que o α -bisabolol é um óleo, ele é proposto como substância a ser encapsulada, constituindo, simultaneamente, em parte ou todo o núcleo oleoso das nanocápsulas. Adicionalmente, o α -bisabolol também é utilizado para a preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados, apresentando-se desta forma como componente estrutural, além de constituir a substância carregada, nos dois nanosistemas.

Devido às potencialidades da utilização do α -bisabolol já relatadas na literatura, as formulações propostas neste trabalho serão avaliadas quanto ao efeito citotóxico sobre células de glioma e melanoma, além do efeito gastroprotetor.

2. OBJETIVO

Desenvolvimento de formulações nanoestruturados contendo α -bisabolol, estudo da influência da modificação do núcleo oleoso sobre a liberação e permeação *in vitro* e avaliação de suas atividades citotóxica e gastroprotetora.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas contendo α -bisabolol e avaliação da atividade citotóxica em linhagem celular de glioma de rato (C6) (Capítulo 1).
- Desenvolvimento de formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados e avaliação *in vitro* da permeação cutânea de nanopartículas contendo α -bisabolol, atividade citotóxica e captação celular em linhagem de melanoma (SK-MEL-28) (Capítulo 2).
- Avaliação da atividade antiulcerosa de formulações nanoparticuladas em modelos *in vivo* de indução de úlceras por etanol e indometacina (Capítulo 3, artigo científico).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Nanotecnologia

3.1.1. *Nanobiotecnologia*

A fusão de duas abordagens tecnológicas, a biotecnologia e a nanotecnologia, representa a nanobiotecnologia, a qual apresenta enormes inovações e potencialidades. Nos últimos anos, um considerável interesse tem sido dado aos materiais biodegradáveis nanoestruturados para aplicações em diversas áreas biomédicas, como carreadores de fármacos, biossensores, biomarcadores e imagens moleculares (Emerich & Thanos, 2006). Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanomedicamentos (fármacos encapsulados), além da nanocosmética (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis).

De forma relevante, a nanobiotecnologia se mostra promissora em aumentar a aplicabilidade terapêutica de fármacos. Na área de tecnologia farmacêutica, os principais objetivos dos estudos envolvendo carreadores concentram-se em aumentar o controle de liberação, a especificidade e a seletividade ao local de ação do fármaco, bem como a diminuição da dose e dos efeitos colaterais (Couvreur *et al.*, 2002).

3.1.2. *Sistemas carreadores de fármacos*

A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada à sua concentração no sítio de ação. Como a distribuição das moléculas no organismo está diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, a associação de fármacos a sistemas carreadores tem sido considerada uma alternativa, visando ao controle de sua distribuição no organismo (Couvreur *et al.*, 2002; Nicolas *et al.*, 2013).

O controle de liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de entrega e do regime de dosagem das substâncias têm sido uma área de pesquisa de muito interesse. Dentre esses carreadores, estão

as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (Puisieux *et al.*, 1994; Soppimath *et al.*, 2001; Schaffazick *et al.*, 2003).

Carreadores coloidais de fármacos como lipossomas, complexos lipídicos, nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas, apresentam-se como veículos promissores para administração de fármacos lipofílicos pelas vias intravenosa (Ahmed *et al.*, 2008; Couvreur *et al.*, 2002), oral (Frezza *et al.*, 2010; Bowman & Leong, 2006), cutânea (Alvarez-Róman *et al.*, 2001) e oftálmica (Katzer *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2004). A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas apresenta como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo fármaco não vetorizado (Guterres *et al.*, 2001). Outro aspecto importante é a possibilidade de diminuição das doses e do número de aplicações, de modo que os pacientes apresentem maior adesão ao tratamento. Além disso, em alguns casos, o nanoencapsulamento pode ter como objetivo a melhora da biodisponibilidade de um fármaco através do aumento da estabilidade desse nos fluidos biológicos, ou ainda o aumento de estabilidade da própria formulação farmacêutica (Couvreur *et al.*, 2002; Couvreur & Vauthier, 2006).

Sistemas nanoestruturados para o carreamento de fármacos têm sido propostos com destaque para agentes antitumorais (Fonseca *et al.*, 2002), peptídeos (De-Hong *et al.*, 2010), proteínas (Tan *et al.*, 2010), vacinas (Csaba *et al.*, 2009), oligonucleotídeos (Fattal *et al.*, 2010) e agentes anti-infecciosos (Taylor *et al.*, 2009).

3.1.3. *Nanopartículas poliméricas*

Nanopartículas podem ser definidas como sistemas coloidais que apresentam diâmetros inferiores a 1 μm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural. O termo nanopartícula inclui nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas, microemulsões, lipossomas e niossomas (Schaffazick *et al.*, 2003; Guterres *et al.*, 2007). As nanopartículas poliméricas podem consistir de uma matriz polimérica, onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido, sem apresentar óleo na sua composição, constituindo as nanoesferas; assim como de um invólucro polimérico disposto sobre um núcleo oleoso, constituindo as nanocápsulas. Neste último caso, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo

e/ou adsorvido à parede polimérica (Soppimath *et al.*, 2001; Schaffazick *et al.*, 2003; Álvarez-Román *et al.*, 2004). Devido as suas características físico-químicas, as nanocápsulas podem ser consideradas como sistema reservatório (Couvreur *et al.*, 2002).

Os materiais poliméricos são extensivamente utilizados no encapsulamento de fármacos, objetivando mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação e o transporte através de membranas, e/ou facilitar sua absorção/penetração cutânea (Couvreur & Vauthier, 2006). Além disso, através de um planejamento químico-estrutural das nanopartículas poliméricas, modificações de superfície podem possibilitar um melhor controle farmacocinético e vetorização de agentes terapêuticos (Faraji *et al.*, 2009). Para aumentar o tempo das nanopartículas na circulação sanguínea e, conseqüentemente, o seu acúmulo no local de ação do fármaco, as nanopartículas podem sofrer modificações na superfície, como o revestimento com polietilenoglicol (PEG) (Hans & Lowman, 2002).

Comparadas com outros carreadores coloidais, as nanopartículas poliméricas apresentam maior estabilidade quando estão em contato com fluídos biológicos (Roney *et al.*, 2005). Uma vez que possuem diâmetros bastante inferiores a 5 μm (diâmetro dos capilares venosos e arteriais), as nanopartículas podem ser administradas por via intravenosa (Hans & Lowman, 2002). Contudo, quando administradas por essa via, a superfície hidrofóbica da maioria dessas estruturas promove uma adsorção de proteínas (opsonização) e posterior fagocitose por células do sistema imunológico. No entanto, estratégias de modificação de superfície das nanopartículas propostas na literatura já propiciaram o desenvolvimento de nanopartículas furtivas, que são caracterizadas por permanecer longo tempo na circulação sem serem fagocitadas (Brigger *et al.*, 2002).

Dentre os polímeros empregados para a preparação de nanopartículas, destaca-se a poli(ϵ -caprolactona) devido a suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas. Por ser um polímero semi-cristalino, apresenta um perfil de degradação mais lento quando comparado aos polímeros amorfos e constitui

um dos mais importantes polímeros biodegradáveis com emprego na medicina (Pohlmann *et al.*, 2013; Guterres *et al.*, 2007; Lu & Chen, 2004). Além disso, por ser um poliéster, apresenta propriedade bioadesiva, o que confere um acréscimo na deposição das partículas na mucosa do trato gastrointestinal, aumentando assim a absorção sistêmica de fármacos (Lamprecht *et al.*, 2000a). Desta forma, vários trabalhos têm demonstrado a importância da utilização deste material polimérico no desenvolvimento de sistemas carreadores nanoparticulados de fármacos (Lamprecht *et al.*, 2000a; 2000b; Sinha *et al.*, 2004; Lu & Chen, 2004; Fattal *et al.*, 2007), sendo estes empregados inclusive para uso intravenoso (Ravi Kumar, 2000).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diversos métodos desenvolvidos nos últimos 30 anos. De uma forma geral, esses métodos podem ser classificados em duas categorias principais, levando em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) ou se estas são formadas diretamente utilizando um polímero pré-formado (Couvreur *et al.*, 2002; Fattal & Vauthier, 2002; Schaffazick *et al.*, 2003; Soppimath *et al.*, 2001). Dentre esses, destaca-se o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados seguido por evaporação do solvente, proposto por Fessi e colaboradores (1989). Esse é considerado um método simples, pelo qual se obtêm partículas com diâmetros médios situados entre 200 e 500 nm, e que por ser baseado na precipitação de polímeros evita a formação de monômeros residuais potencialmente tóxicos.

Para a formação da dispersão coloidal das partículas de polímero e a indução da separação de fases é utilizado um sistema solvente/não solvente totalmente miscível. Dessa forma, as partículas formam-se espontaneamente e instantaneamente. No processo, o polímero, o fármaco, o constituinte oleoso e opcionalmente um tensoativo lipofílico são dissolvidos em um solvente semi-polar solúvel em água. Essa solução é injetada em uma solução aquosa contendo um tensoativo hidrofílico, sob agitação magnética. Assim, o óleo encontra-se disperso na mistura solvente/não-solvente e o polímero deposita-se ao redor da gotícula formada. As nanocápsulas possuem amplo emprego no encapsulamento de fármacos lipossolúveis (Schaffazick *et al.*, 2003), estando o fármaco, no caso, geralmente dissolvido

ou disperso na fase interna oleosa ou adsorvido ao polímero (Couvreur *et al.*, 2002).

Entre as vantagens da utilização desse método está a obtenção espontânea, simples, eficiente e reprodutível de pequenas partículas em escala nanométrica com elevada capacidade de encapsulação de fármacos (Fessi *et al.*, 1989; Schaffazick *et al.*, 2003; Guterres *et al.*, 2007). Dentre os fatores que determinam o diâmetro da partícula a ser obtida estão a concentração do polímero e do fármaco, a quantidade de tensoativo, a concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica sobre a aquosa (Couvreur *et al.*, 2002).

Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, Jäger e colaboradores (2009) desenvolveram um novo tipo de nanocápsula polimérica denominada nanocápsula de núcleo lipídico (LCN). Estas contêm uma parede polimérica de poli(ϵ -caprolactona) envolvendo um núcleo constituído de uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos caprílico e cáprico. Nanocápsulas de núcleo lipídico são novos carreadores com grande potencial na aplicação na nanomedicina, visto que há uma possibilidade de maior encapsulação de fármacos lipofílicos em comparação com nanocápsulas com núcleo constituído apenas de óleo (Venturini, 2011).

Para a preparação dessas nanopartículas de núcleo lipídico, no entanto, Venturini e colaboradores (2011) observaram que existe uma proporção ideal dos componentes na fase orgânica para que se obtenha apenas um tipo de partícula na suspensão final. Através de um estudo de formulação, utilizando diferentes proporções de componentes, foi determinado que a formulação preparada com 1:4,1:2,6 de monoestearato de sorbitano, triglicerídeos caprílico e cáprico e PCL, respectivamente, apresentava apenas nanocápsulas (sem a presença concomitante de nanoemulsão ou nanoesferas).

Um estudo desenvolvido por Jornada e colaboradores (2012), utilizando a proporção ideal estabelecida por Venturini e colaboradores (2011), determinou que existe uma concentração crítica dos componentes da fase orgânica, acima da qual não é possível garantir o controle do tamanho

de partícula final. Concentrações superiores a essa, provocam a formação de pré-estruturas na fase orgânica tendo como consequência a formação de partículas micrométricas na suspensão final. A partir da manutenção da concentração dos componentes da fase orgânica abaixo da concentração de agregação crítica, através da manutenção da quantidade de solvente orgânico e aquoso, foi demonstrado ser possível aumentar a fração volumétrica da formulação, podendo-se utilizar uma maior quantidade de polímero, tensoativo e óleo para um mesmo volume final de formulação.

3.1.4. Nanopartículas lipídicas

Com o intuito de contornar algumas limitações apresentadas pelos carreadores nanométricos já existentes, como o custo de produção e a utilização de solventes orgânicos no processo de preparação, foram desenvolvidas as nanopartículas lipídicas, que são derivadas de emulsões O/A com a substituição do óleo por um lipídio sólido, permanecendo neste estado à temperatura corporal (Müller *et. al.*, 2007). As principais vantagens desse sistema são a utilização de lipídios biocompatíveis, a possibilidade de não utilização de solventes orgânicos na preparação e a facilidade de produção em larga escala (Zur Mühlen *et. al.*, 1998; Souto *et. al.*, 2007; Guterres *et. al.*, 2007).

Por serem compostos de lipídios sólidos, as partículas formadas possuem uma baixa eficiência de encapsulação do fármaco, apresentando a sua recorrente expulsão das nanoestruturas. Visando aumentar a capacidade de carga de ativo, formulações com lipídios sólidos e líquidos foram desenvolvidas e denominadas carreadores lipídicos nanoestruturados. Esses carreadores não possuem uma estrutura altamente ordenada, favorecendo a melhor acomodação do fármaco (Wissing e Müller, 2003a; Müller *et. al.*, 2004).

O método mais utilizado na preparação de nanopartículas lipídicas é o processo *top-down* de homogeneização a alta pressão. Esta técnica produz nanopartículas de tamanhos homogêneos, dependendo da composição qualitativa e condições de homogeneização. Além disso, acarreta uma alta estabilidade física para dispersões aquosas. A homogeneização a quente (fase lipídica fundida a alta temperatura) é a mais utilizada, pois proporciona

tamanho e distribuição de partículas menores (Mehnert e Mäder, 2001). A preparação das nanopartículas inicia-se com a formação de uma emulsão primária, através da dispersão da fase oleosa em uma solução aquosa aquecida contendo o tensoativo. Essa emulsão primária é levada ao homogeneizador à alta pressão, obtendo-se ao final uma nanoemulsão devido ao alto cisalhamento provocado pelo equipamento. Após essa emulsão é resfriada, permitindo que o lipídio se recristalize e forme as nanopartículas lipídicas sólidas (Mehnert e Mäder, 2001; Souto *et al.*, 2007; Üner, 2006).

Dentre os diversos tipos de lipídios que podem ser utilizados para a preparação das nanopartículas lipídicas, têm-se a manteiga de cacau. O cacau é consumido desde os tempos mais remotos, sendo difundido pelas civilizações Maia e Asteca. O cacauzeiro (*Theobroma cacao L.*) é uma árvore nativa da América Central (Criollo), com híbridos desenvolvidos na Bacia Amazônica (Forastero) (Solorzano *et al.*, 2012). A manteiga de cacau é produzida a partir da semente do cacau e é composta por ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e polifenóis (Ribeiro *et al.*, 2012). O cacau é rico em polifenóis, particularmente em flavan-3-ols ou flavonóis, como formas monoméricas (-)-epicatequina e (+)-catequina, e as formas oligoméricas como as procianidinas (Pimentel, 2007). É altamente estável e rico em substâncias antioxidantes, o que desperta o interesse no seu uso como matéria-prima nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, sem ser verificada, até o momento, toxicidade em relação à sua utilização (Smit, 2011).

3.2. α -bisabolol

O α -(-)- bisabolol (Figura 1) é um álcool sesquiterpeno oleoso com massa molecular de 222,37 Da; amplamente utilizado em fragrâncias e preparações cosméticas devido a sua característica não-alérgica (Madhavan, 1999). Esse composto oleoso apresenta um odor floral doce e é frequentemente encontrado em várias plantas, incluindo a camomila (*Matricaria chamomilla*). Em 1951, Isaac e colaboradores isolaram este composto das sumidades floridas da camomila, sendo que, o óleo essencial

desta planta contém até 50% de α -bisabolol, molécula considerada o principal contribuinte para o efeito anti-inflamatório da camomila (Jakovlev *et al.*, 1969, 1979).

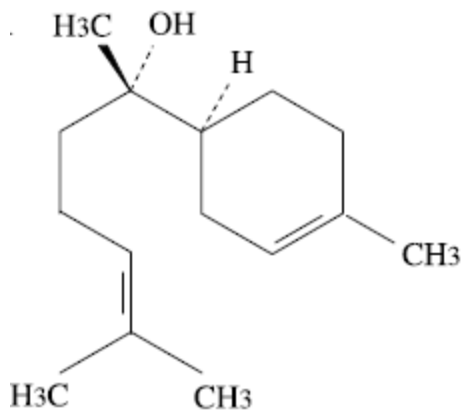


Figura 1. Estrutura molecular do α -bisabolol.

É uma substância vastamente conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias (Thiele *et al.*, 1969; Jakovlev *et al.*, 1979), inclusive no tratamento da artrite, e por sua habilidade de aumentar a penetração transepidérmica de fármacos (Kadir & Barry, 1991). Os compostos sesquiterpenos, como o α -bisabolol parecem ser bons inibidores da 5-lipoxigenase (5-LOX), apresentando valores de IC_{50} sobre a 5-LOX entre 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ (Baylac *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram as propriedades antibacterianas e antifúngicas do α -bisabolol, além da capacidade em prevenir o desenvolvimento de úlceras gástricas (Szelenyi *et al.*, 1979). Devido a sua atoxicidade em animais (LD_{50} 13-14 g/kg) (Budavari *et al.*, 1996) é amplamente utilizado em preparações cosméticas, inclusive para o tratamento de dermatites (Grassi *et al.*, 2000). Entretanto, são escassos os trabalhos científicos que focalizam os seus efeitos biológicos (Hernandez-Ceruelos *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2001).

O bisabolol é um composto lipofílico que apresenta tendência à oxidação. Os produtos de oxidação são essencialmente dois óxidos de bisabolol, os quais apresentam atividade anti-inflamatória 50% inferior à substância de origem (Schilcher, 1987). Um aumento da estabilidade dos

óleos da camomila frente à oxidação foi demonstrado quando estes foram complexados com ciclodextrinas (Szejtli *et al.*, 1980; Thoss *et al.*, 1994).

3.2.1. α -bisabolol para tratamento de gliomas

Gliomas têm sido definidos patologicamente como tumores que apresentam evidência histológica, imunohistoquímica e estrutural de diferenciação glial (Maher *et al.*, 2001). Os gliomas contabilizam mais de 80% dos tumores malignos primários do SNC (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Esses representam um dos maiores desafios na oncologia moderna e embora novos paradigmas terapêuticos tenham determinado impacto significativo no prognóstico de diversas malignidades, a sobrevida entre os pacientes acometidos por glioma não se alterou nas últimas décadas (Rich & Bigner, 2004). Este fato, em parte, deve-se a uma de suas características cardinais, a alta propensão para infiltrar-se através do cérebro, determinando a impossibilidade de cura cirúrgica mesmo quando a localização do tumor permite ampla margem de ressecção (Rao *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2001). Além disso, devido ao seu elevado grau de proliferação, há comprometimento do tecido adjacente ao tumor, desencadeando sintomas como cefaléia, alterações comportamentais e cognitivas, edema de papilas, disfasia e hemiparesia progressiva (Girolami, 2000).

Os pacientes acometidos por glioblastomas apresentam um péssimo prognóstico, uma vez que, apesar de existirem intensos esforços buscando desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis (Konopka & Bonni, 2003). Apesar dos grandes avanços em neuroradiologia, neurocirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida média dos pacientes com glioma pouco se alterou nos últimos 30 anos, variando entre 9 a 12 meses, sendo que a maioria dos pacientes morre no período de 2 anos e 3,3% sobrevive 5 anos (Bondy *et al.*, 2008).

A cirurgia, atualmente, representa a única abordagem com potencial curativo para a maior parte das malignidades sólidas; entretanto, os glioblastomas, na prática, são incuráveis. O tratamento objetiva a melhora dos déficits neurológicos (inclusive função cognitiva) e o aumento da sobrevida, mantendo a melhor qualidade de vida possível. A ressecção

completa do tumor é limitada pela alta invasividade microscópica das células tumorais no tecido saudável adjacente (Behin *et al.*, 2003), sendo a recorrência do tumor a regra, uma vez que mesmo após a remoção cirúrgica com margens livres, permanece no tecido normal uma população de células tumorais (Rooprai *et al.*, 1999). Desta forma, a maioria dos pacientes recebe tratamento adjuvante, como radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória (Mazeron & Kantor, 1998). Ambas as abordagens têm eficácia limitada devido à ausência de especificidade terapêutica dos fármacos citotóxicos atuais contra esta neoplasia, a quimiorresistência intrínseca destes tumores e a baixa tolerância do tecido normal aos efeitos tóxicos da terapia. Além disso, a barreira hemato-encefálica (BHE) é limitante à entrada dos quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos de caráter altamente lipofílico, como temozolomida e nitrosuréias, podem ser utilizados (Mousseau *et al.*, 1993). O arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento dos glioblastomas é incapaz de alterar substancialmente o prognóstico destes pacientes, justificando esforços no intuito de desenvolver e aprimorar abordagens inovadoras.

Em alguns estudos da literatura foi demonstrado que o α -bisabolol possui efeito citotóxico tempo e dose-dependente sobre linhagens celulares malignas de glioma de rato e de humano, induzindo a apoptose das mesmas (Cavalieri *et al.*, 2004). Sua atividade citotóxica frente a linhagens celulares de carcinoma pancreático foi também demonstrada (Darra *et al.*, 2008). Darra e colaboradores (2008) descreveram que o α -bisbolol pode ser rapidamente incorporado em *rafts* lipídicos: domínios de membrana altamente dinâmicos e enriquecidos com esterol e esfingolipídeos, que desenvolvem importante papel no transporte de proteínas intracelular e fusão de membrana. Quanto a isto, tem sido relatado que as membranas plasmáticas de células tumorais contêm muito mais *rafts* lipídicos que as membranas plasmáticas de células normais (Patra & Bettuzzi, 2007). Recentemente, Cavalieri e colaboradores (2009), buscando investigar o mecanismo de morte envolvido, sugeriram que esta toxicidade está intimamente relacionada a sua concentração intracelular. Uma análise das concentrações intracelulares de α -bisabolol em células de glioma de linhagem humana mostrou que ele é rapidamente distribuído em

frações na membrana, citosol e núcleo, enquanto que as mesmas condições impostas a fibroblastos indicou uma distribuição intracelular bastante baixa. Os resultados sugerem que uma vez incorporado em *rafts* lipídicos de membrana é rapidamente transportado para o interior da célula. Os estudos demonstraram também que o consumo de oxigênio em célula tumoral exposta a 5 µg de α -bisabolol durante 20 minutos foi 50% menor. Quando a mesma concentração foi utilizada sobre fibroblastos, observou-se que durante 40 minutos de incubação não ocorreu nenhuma diminuição no consumo de oxigênio. A ciclosporina A, um inibidor específico da abertura de poro de permeabilidade mitocondrial (mPTP), foi capaz de abolir o efeito tóxico do α -bisabolol sobre a respiração celular em células de glioma de linhagem humana T67, sugerindo que seu efeito está dessa forma, diretamente relacionado a abertura de poros na membrana mitocondrial (Cavaliere *et al.*, 2009).

Devido ao seu caráter lipofílico, o α -bisabolol apresenta baixa solubilidade em fluídos biológicos. No tratamento de neoplasias do SNC, uma substância potencial deve apresentar baixa toxicidade, suficiente solubilidade no sangue para estar biodisponível e suficiente lipofilicidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Para aumentar a hidrofiliicidade do α -bisabolol, o que influenciaria em suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (Martínková, 2001) a glicosilação da molécula foi proposta, de forma a aumentar a permeabilidade através de barreiras biológicas (Poduslo and Curran, 1994; Egleton *et al.*, 2001). Como resultado, foi observado um aumento na atividade citotóxica frente a linhagens celulares de glioma quando comparado ao α -bisabolol (obtiveram IC₅₀ entre 40- 64 µg para os compostos preparados) e uma maior adequação aos parâmetros físico-químicos necessários para atravessar passivamente a barreira hematoencefálica (BHE) (Piochon *et al.*, 2008).

Em trabalho anterior desenvolvido por Terroso (2010) observou-se atividade para o α -bisabolol veiculado em nanocápsulas poliméricas (concentração 16 mg/mL) em linhagem celular de glioma (C6). Neste trabalho foi demonstrado que a formulação de nanocápsulas contendo α -bisabolol apresentou-se eficaz em reduzir a viabilidade e a proliferação celular nesta

linhagem. Além disso, observou-se que o efeito citotóxico das nanocápsulas foi seletivo para as células tumorais, fato evidenciado pela ausência de toxicidade dessa formulação sobre culturas organotípicas de hipocampo de ratos.

Ainda, dentre as potencialidades da utilização da nanotecnologia para o tratamento de gliomas, é descrito na literatura que alterações na superfície das nanopartículas podem aumentar o transporte de fármacos através da BHE. Nanopartículas de doxorrubicina revestidas com polietilenoglicol (PEG) foram mais eficazes em reduzir o diâmetro tumoral em modelo de tumor cerebral quando comparado à doxorrubicina na forma convencional (solução) ou em nanopartículas não-revestidas (Petri et al., 2007). Além disso, o revestimento das nanopartículas poliméricas com polissorbato 80 (Tween 80[®]) foi relatado pela literatura como fundamental para a vetorização cerebral (Koziara et al., 2003; Ambruosi et al., 2006; Zhang et al., 2006). Uma possível explicação sustenta-se no fato de que o polissorbato 80 seletivamente promoveria a adsorção de certas proteínas plasmáticas, como a apolipoproteína E, na superfície das nanopartículas. Assim, as nanopartículas contendo apolipoproteína E adsorvida seriam reconhecidas como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo transportadas pelas células endoteliais da BHE através de endocitose receptor-mediada (Calvo et al., 2001, Kreuter et al., 2002).

3.2.2. *α-bisabolol para tratamento de melanoma*

O melanoma maligno é uma neoplasia agressiva com propensão para metástases e resistência à terapia, cuja frequência está aumentando a um ritmo alarmante e vem apresentando uma alta taxa de mortalidade. Este tumor resulta da proliferação e da transformação maligna dos melanócitos (Fitzpatrick et al., 2005). Caracteriza-se por ter uma proliferação celular composta por inúmeros melanócitos com variações de tamanho e forma localizados na camada basal e invasão posterior das camadas superiores da derme papilar (Barnhill et al., 2008). Neste processo estão envolvidos vários fatores genéticos e ambientais. Há uma elevada incidência entre caucasianos e surge mais frequentemente por volta dos 50 anos de idade (Corell et al.,

2008). W.Clark descreveu, em 1969, duas formas de crescimento tumoral nos melanomas: radial ou horizontal e vertical. O crescimento radial caracteriza-se pela proliferação de melanócitos atípicos ao longo da junção dermoepidérmica. No crescimento vertical ocorre invasão da derme pelas células tumorais.

A incidência e mortalidade relacionados ao melanoma maligno cutâneo vêm aumentando progressivamente nos últimos anos. A elevada incidência deste tumor deve-se essencialmente às modificações de estilo de vida, aos hábitos de exposição solar, sobretudo exposição solar na infância e adolescência (às queimaduras solares ocorridas durante essas fases) e às modificações da radiação solar (Sanchez et al., 2006). Ainda, fatores como o fototipo da pele (ocorre principalmente nos fototipos I e II), história familiar de melanoma, grau de desenvolvimento dos nevos e idade podem acarretar em maior incidência (Whiteman et al., 2006).

A cura do melanoma está relacionada com a excisão do tumor na sua fase inicial, ficando assim estabelecida a necessidade do diagnóstico precoce. Para avaliação do prognóstico é realizada a medição da espessura do tumor, desde a camada granulosa da epiderme até a camada mais profunda do tumor (índice de Breslow), de forma que quanto maior a espessura, pior é o prognóstico. Pacientes com melanomas com índice de Breslow inferior a 0,76 mm têm uma sobrevida em 5 anos de cerca de 100%. Contudo se existir metástase de gânglio linfático a sobrevida no mesmo período decai para 10 a 50% (Fitzpatrick et al., 2005, Corell et al., 2008). W.Clark (1969) descreveu cinco níveis de gravidade para o melanoma que correspondem ao grau de profundidade e de proliferação neoplásica, sendo o estágio I localizado somente na epiderme, os estágios II, III e IV apresentando graus de infiltração crescentes à derme, e o estágio V apresentando invasão do tecido celular subcutâneo.

Atualmente o melanoma é tratado através da remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, criocirurgia, entre outras técnicas. A remoção cirúrgica em pacientes com lesão inferior a 1 mm acarreta em taxa de sobrevida dentro de um ano de 90%. Por sua vez, para lesões com maior espessura a taxa de sobrevida pode ser reduzida para até 50% (Gonzales et al., 2008). Para os melanomas estágio I, II e III, realiza-se apenas

acompanhamento em ambulatório após a remoção cirúrgica (Santos e et al., 2006). Para os pacientes acometidos de lesões com subtipos IV e V com biópsia de gânglio sentinela positivo realiza-se tratamento adjuvante com Interferon α (INF) pelo período de aproximadamente um ano. No entanto, o tratamento com INF possui diversos efeitos secundários como astenia, anorexia, hepatotoxicidade, neuropenia e alterações tiroideas. Esse tratamento não aumenta a sobrevida global do paciente mas melhora a sobrevida livre de doença em alguns meses, sendo a sobrevida livre de doença em 5 anos de 10% (Santos e et al., 2004). Os tratamentos não cirúrgicos para melanomas são limitadas a terapias adjuvantes, tais como terapias imunológicas e fotodinâmica (Martinez e Otley, 2001). Por esta razão o tratamento de melanoma avançado continua a ser um desafio na dermatologia (Bundscherer et al., 2008). Para o tratamento tópico do melanoma maligno cutâneo, apenas o imiquimod é aprovado. A terapia local tem vários objetivos, incluindo o controle focal da doença com toxicidade sistêmica reduzida e o potencial teórico de induzir uma reação imune sistêmica contra o tumor. Essa terapia vem sendo utilizada em paciente com lesões irresecáveis, múltiplas ou localmente avançadas (estágios III e IV). A era moderna do tratamento intra-lesional iniciou na década de sessenta, no princípio com uso de BCG, a qual apresentava boa resposta local, porém a toxicidade elevada levou a redução de seu uso clínico.

Estudos na literatura demonstraram que o α -bisabolol apresenta ação citotóxica frente a linhagem de melanoma (Stefanello et al., 2011, Piochon *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2010). No entanto, alguns estudos visavam modificações estruturais visando o aumento desta ação. Uma vez que o α -bisabolol é uma molécula lipofílica, apresenta baixa solubilidade nos fluidos biológicos. Piochon e colaboradores (2008) sintetizaram e testaram α -bisabolol-glicosídeos visando aumentar a hidrofiliabilidade e desta forma melhorar as propriedades farmacocinéticas do ativo. Objetivaram também com a glicosilação da molécula o aumento da permeabilidade através das barreiras biológicas. Silva e colaboradores (2010) também realizaram a modificações na estrutura do α -bisabolol, sendo utilizado como bloco quiral para construção de tiosemicarbazonas devido a sua reatividade, permitindo a

adição de ácido. Estas modificações na estrutura foram realizadas visando um aumento da atividade citotóxica da molécula sobre o melanoma.

O tratamento tópico de doenças da pele é muito atraente, uma vez que com a distribuição sistêmica de ativos farmacêuticos reduzida, possivelmente também são reduzidos os efeitos colaterais sistêmicos. A utilização de veículos que facilitem a passagem de substâncias através da barreira formada pelo estrato córneo é tema corrente em pesquisas, incluindo abordagens como a utilização de promotores de penetração e também o desenvolvimento de sistemas carreadores particulados. Os sistemas micro- e nanoparticulados são desenvolvidos com intuito de não somente aumentar a absorção percutânea, mas também, permitir a vetorização na pele ou ainda para suas subestruturas (Schafer-Korting *et al.*, 2007).

3.2.3 α -bisabolol para prevenção de úlceras gástricas

A úlcera é uma lesão benigna da mucosa gástrica ou duodenal causada principalmente quando há exposição do epitélio, à agentes químicos agressores, ao suco gástrico e outras secreções intestinais. A incidência das úlceras pépticas é maior nos homens do que nas mulheres (1,3 : 1), sendo que as úlceras duodenais ocorrem com maior frequência na faixa etária entre 30 e 55 anos, enquanto as úlceras gástricas na faixa entre 50 e 70 anos (Olinda *et al.*, 2008).

A principal causa de ulceração é o desequilíbrio entre a secreção do suco gástrico e o grau de proteção conferido pela barreira mucosa e pela neutralização do ácido gástrico (Guyton e Hall, 2005). Entre os principais fatores que podem causar esse desequilíbrio estão: estresse, infecção por *Helicobacter pylori*, consumo de medicamentos (principalmente anti-inflamatórios não-esteróides – AINEs e agentes anticancer) e consumo de álcool (Singh *et al.*, 2007).

Úlceras gástricas associadas ao uso de AINEs permanecem como um dos maiores problemas clínicos. No consumo de AINEs os danos causados à mucosa gástrica podem ser gerados por lesão direta ou por uma redução na produção de prostaglandinas (PGE₂). Esses fármacos possuem uma natureza lipofílica ligando-se facilmente à mucosa gástrica, o que induz a

lesão local. Seu principal mecanismo de ação é a inibição sistêmica da ciclooxigenase (COX), principal enzima na via da produção de prostaglandinas. As prostaglandinas são responsáveis pela liberação de ácido das células parietais da parede estomacal e pela produção de muco. Sua inibição leva a uma baixa produção do muco protetor e uma alta liberação de ácido clorídrico (Ramsay e Carr, 2011).

Além das prostaglandinas, os AINEs também interferem no segundo maior sistema defensivo da mucosa gástrica, a via L-arginina/óxido nítrico (NO). A via NO atua na regulação da secreção de ácido gástrico bem como na modulação da integridade da mucosa gástrica juntamente com prostaglandinas endógenas. Em modelos animais de úlcera gástrica, enquanto a inibição da NO sintase agrava lesões, a administração do precursor de NO, L-arginina, protege quase que completamente contra a indução de ulceração por indometacina, através de um mecanismo independente de modulação da secreção de ácido ou atividade péptica, apenas através de manutenção de NO na mucosa (Jainu e Devi, 2006; Heeba *et al.*, 2009).

As úlceras estomacais também podem ser provocadas ou agravadas pelo uso crônico ou agudo de álcool. Embora exista uma diferença entre o uso do etanol (solvente) e bebidas alcoólicas, os mecanismos fisiopatológicos que podem levar a uma lesão provocada por esses na mucosa gástrica em humanos saudáveis ainda permanecem pouco compreendidos. A hipótese inicial era de um aumento na produção do ácido gástrico e da gastrina em resposta ao consumo, contudo essa foi refutada (Teysse e Singer, 2003). Atualmente acredita-se que os efeitos do etanol sobre a mucosa sejam devido a um rompimento e um aumento da permeabilidade da barreira de muco protetora da parede estomacal (Bode e Bode, 1997; Francis, 2008). Além disso, resultados experimentais sugerem que o estresse oxidativo está envolvido na maioria das patologias gastrintestinais, incluindo as úlceras gástricas (Llesuy., 2002).

Diversas estratégias têm sido descritas na literatura para redução de toxicidade gastrintestinal de anti-inflamatórios não esteroides, entre estas pode-se citar a incorporação em lipossomas (Soehngen *et al.*, 1988, Srinath *et al.*, 2000), complexação com ciclodextrinas (Oteroespinar *et al.*, 1991; Lin

et al., 1994, Alsarra *et al.*, 2010), a micro- e nanoencapsulação (Ammoury *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1993; Giunchedi *et al.*, 1995; Guterres *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2012), e o desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação modificada (Cerdeira *et al.*, 1998; González-Rodríguez *et al.*, 2003), entre outras.

A micro- e nanoencapsulação de fármacos anti-inflamatórios foi estudada pelo nosso grupo de pesquisa. Guterres e colaboradores (1995) mostraram que a incorporação do diclofenaco em nanocápsulas de poli(ácido láctico) reduziu a toxicidade do fármaco sobre a mucosa gastrintestinal. Müller e colaboradores, utilizaram a secagem por aspersion na obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas contendo diclofenaco e demonstraram a manutenção dos efeitos protetores sobre a mucosa gástrica já demonstrados por Guterres. Beck e colaboradores (2006) avaliaram a diferença entre duas nanoestruturas e demonstraram que micropartículas revestidas por nanocápsulas contendo diclofenaco apresentaram efeito protetor da mucosa gástrica contra a ulceração, enquanto micropartículas revestidas por nanoesferas não apresentaram tal proteção.

Embora existam trabalhos que avaliam a nanoveiculação como estratégia para diminuir os efeitos de toxicidade gastrintestinal de fármacos, são poucos os estudos que avaliam a nanoencapsulação de fármacos gastroprotetores. A avaliação do potencial antiulceroso de substâncias vem sendo amplamente descrita na literatura. Os modelos de indução de lesões em ratos e camundongos geralmente utilizam ácido acético, anti-inflamatórios não esteroides, etanol, interrupção do fluxo pilórico ou analgésicos (Konturek *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Petrovic *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2003).

Entre os tratamentos disponíveis para úlceras gástricas estão os agentes que neutralizam o ácido gástrico e inibem a secreção gástrica, como inibidores da bomba de prótons, inibidores seletivos da cicloxigenase-2 e antagonistas dos receptores de histamina H₂. Essas terapias se baseiam na administração de fármacos em formulações-padrão, como comprimidos e cápsulas (Guedes *et al.*, 2008; Schroeter *et al.*, 2008). Nos últimos anos, tem-se buscado alternativas aos agentes usuais no combate a dispepsia gástrica e úlceras pépticas. Em termos de terapia seletiva, é desejável que fármacos possuam apenas atividade local com absorção limitada para outros

tecidos, de forma a diminuir os efeitos adversos e aumentar a eficiência local (Hasani *et al.*, 2009).

Estudos mostraram que a administração oral de α -bisabolol nas doses de 100 e 200 mg/Kg foi capaz de proteger a mucosa gástrica de danos causados pela administração de etanol (Rocha *et al.*, 2010). É bem descrita na literatura a habilidade do etanol absoluto em aumentar a quantidade de malondealdeído, o que está intimamente relacionado com o dano gástrico. O aumento nos níveis de malondealdeído é também associado com a apoptose aumentada no tecido gástrico em animais submetidos ao tratamento oral com etanol absoluto (Li *et al.*, 2011). Além disso, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) constituem um sistema antioxidante endógeno, que age prevenindo o dano celular induzido por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Remmen *et al.*, 2004). O etanol foi relacionado ao aumento da produção de ânions superóxido e diminuição da atividade da SOD, contribuindo desta forma com a geração de dano oxidativo (Mutoh *et al.*, 1990; Potrich, 2009).

Dentre os mecanismos envolvidos na proteção da mucosa gástrica exercida pelo α -bisabolol estão a diminuição dos níveis de malondealdeído e aumento da atividade das enzimas SOD e CAT. Além disso, sugere-se que as lesões induzidas por etanol tenham uma característica inflamatória por indução da migração de neutrófilos na lesão, de forma que pode-se relacionar a ação antiulcerativa do α -bisabolol à sua ação anti-inflamatória (Rocha *et al.*, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Matérias-primas*

- α -bisabolol (Deg, Brasil);
- Dimetilsulfóxido (Sigma);
- Fungizona[®] (Gibco);
- Gentamicina (Schering);
- Manteiga de cacau (Delaware);
- Meio Dulbecco modificado (DMEM) (Gibco);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®], EHL = 4,7) (Sigma);
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®], EHL = 4,3) (OXITENO);
- MTT brometo de ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio]) (Sigma);
- Penicillina/streptomicina (Gibco);
- Polissorbato 80 (Monooleato de sorbitano 20 moles de óxido de etileno, EHL = 15,0) (Delaware).
- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Mw=65kg/mol) (Aldrich);
- Propilenoglicol (Synth[®], Brasil);
- Solução de tripsina/EDTA 0.25% (Gibco);
- Soro fetal bovino (Cultilab);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Delaware).

Os demais reagentes e solventes utilizados apresentavam grau analítico ou farmacêutico.

4.2 *Equipamentos*

- Balança analítica – Denver APX200;
- Ultra-turrax - T25, Ika;
- Potenciômetro – Micronal B474;
- Mastersizer[®] 2000, Malvern;
- Zetasizer[®] nano-ZS, modelo ZEN 3600, Malvern;
- Homogeneizador a alta pressão - Panda 2K NS1001L, Niro Soavi;
- Paquímetro digital – Mitutoyo Digimatic Caliper;

- Câmera digital Sony® – modelo Cybershot 8.1 megapixels;
- Evaporador Rotatório – Büchi;
- Espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis – Varian.
- Calorímetro Exploratório diferencial - TA Instruments, modelo Q20
- Microscópio eletrônico de varredura - JEOL JSM 6060
- Microscópio de fluorescência – Olympus IX71 – Software Cellsens standard
- Ultracentrifuga – CP80WX HITACHI, rotor P28S
- Células de franz automatizada - Microetteplus, Hanson
- Citômetro de fluxo - BD FACSVerser, filtro PE.

4.3 Metodologia

A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho será apresentada neste ítem, visando a não repetição de metodologias ao longo do trabalho. Desta forma, nos capítulos 1 e 2 serão apresentados somente os objetivos e resultados específicos.

4.3.1 Preparação das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado conforme proposto por Fessi e colaboradores (1989), com adaptações conforme Venturini e colaboradores (2011). Para uma suspensão de nanocápsulas o polímero e o monoestearato de sorbitano foram dissolvidos em uma mistura de solventes acetona e etanol sob agitação magnética constante à 40 °C. Após, foram acrescentados os óleos, triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TCM) e/ou α -bisabolol. Em frasco separado, o polissorbato 80 foi solubilizado em água. A fase orgânica, totalmente solubilizada, foi injetada na fase aquosa, sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, através de um funil. As suspensões foram mantidas sob agitação por 10 min. A seguir, procedeu-se à evaporação da suspensão em evaporador rotatório, eliminando os solventes orgânicos e o excesso de água à pressão reduzida. O volume final foi ajustado a 25 mL. Foram preparadas formulações com três diferentes concentrações de α -bisabolol no núcleo e também uma formulação de nanocápsulas brancas

(sem α -bisabolol. Ainda, para a realização do teste de gradiente de densidade das partículas, foram preparadas nanoemulsões, da mesma como foram preparadas as nanocápsulas, com omissão da adição do polímero.

Para a preparação de nanocápsulas fluorescentes, 10% da quantidade de polímero foi substituída por polímero ligado a rodamina B. A rodamina B foi covalentemente ligada aos grupos terminais hidroxil da poli(ϵ -caprolactona) sob atmosfera inerte (argônio) utilizando carbodiimida como ativador na conversão de ácido carboxílico em éster (Poletto et al., 2012).

As formulações de nanocápsulas preparadas estão descritas nas Tabelas 1 a 4.

Tabela 1. Composição da formulação de nanocápsula polimérica branca (NC branca).

Fase orgânica	Fase aquosa
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico..... 400 mg	Polissorbato 80..... 192,5 mg
Monoestearato de sorbitano.... 95 mg	Água destilada..... 133 mL
Poli(ϵ -caprolactona)..... 250 mg	
Acetona..... 60 mL	
Etanol..... 7,5 mL	

*No preparo da nanoemulsão (NE16) utilizada no estudo de gradiente de densidade, a adição de PCL foi omitida.

Tabela 2. Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 1 mg/mL (α -BNC1).

Fase orgânica	Fase aquosa
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico..... 375 mg	Polissorbato 80..... 192,5 mg
α -bisabolol 25 mg	
Monoestearato de sorbitano.... 95 mg	Água destilada..... 133 mL
Poli(ϵ -caprolactona)..... 250 mg	

Acetona.....	60 mL
Etanol.....	7,5 mL

Tabela 3. Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL (α -BNC10).

Fase orgânica	Fase aquosa
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico..... 150 mg	Polissorbato 80..... 192,5 mg
α -bisabolol 250 mg	
Monoestearato de sorbitano.... 95 mg	Água destilada..... 133 mL
Poli(ϵ -caprolactona)..... 250 mg	
Acetona..... 60 mL	
Etanol..... 7,5 mL	

*Na formulação (α -BNC10-RB), 10% da poli(ϵ -caprolactona) foi substituída por poli(ϵ -caprolactona) ligada covalentemente a rodamina B.

Tabela 4. Composição da formulação de nanocápsula polimérica contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL (α -BNC16).

Fase orgânica	Fase aquosa
α -bisabolol 400 mg	Polissorbato 80..... 192,5 mg
Monoestearato de sorbitano.... 95 mg	Água destilada..... 133 mL
Poli(ϵ -caprolactona)..... 250 mg	
Acetona..... 60 mL	
Etanol..... 7,5 mL	

*No preparo da nanoemulsão (α -BNE16) utilizada no estudo de gradiente de densidade, a adição de PCL foi omitida.

4.3.2 Preparação das nanopartículas lipídicas de manteiga de cacau (Cocoa-theospheres – CT)

As formulações foram preparadas segundo metodologia adaptada descrita por Müller e colaboradores (2000) e Colomé e colaboradores (2010). Para a preparação das nanopartículas lipídicas, foram selecionadas a manteiga de cacau e os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (TCM) como componentes lipídicos. Foram utilizados tensoativos de alto e baixo EHL, visando uma maior estabilidade das formulações. Para a preparação das partículas, uma fase lipídica fundida a 40 °C foi misturada à fase aquosa utilizando ultra-turrax (16000 rpm por 2 minutos), obtendo uma emulsão primária. Em seguida, esta emulsão foi submetida à homogeneização a alta pressão para a redução do tamanho de partícula. Foi utilizada uma pressão de 500 bar, por quatro ciclos de passagem.

As formulações de nanopartículas lipídicas preparadas estão descritas nas Tabelas 5 a 7.

Tabela 5. Composição da formulação de nanopartícula lipídica branca (CT branca).

Fase lipídica	Fase aquosa
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.....1600 mg	Polissorbato 80..... 600 mg
Monooleato de sorbitano.... 300 mg	Água destilada (qsp).....100 mL
Manteiga de cacau..... 2000 mg	

Tabela 6. Composição da formulação de nanopartícula lipídica contendo α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL (α -BCT10).

Fase lipídica		Fase aquosa	
α -bisabolol	1000 mg	Polissorbato 80.....	600 mg
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.....	600 mg		
Monooleato de sorbitano....	300 mg	Água destilada.....	100 mL
Manteiga de cacau.....	2000 mg		

Tabela 7. Composição da formulação de nanopartícula lipídica contendo α -bisabolol na concentração de 16 mg/mL (α -BCT16).

Fase lipídica		Fase aquosa	
α -bisabolol	1600 mg	Polissorbato 80.....	600 mg
Monooleato de sorbitano....	300 mg	Água destilada.....	100 mL
Manteiga de cacau.....	2000 mg		

4.3.3 Caracterização físico-química das formulações

4.3.3.1 Determinação do teor de α -bisabolol nas formulações

Para a quantificação do α -bisabolol, cada suspensão (100 μ L) foi tratada com água (10 ml) e uma alíquota (1 mL) foi diluída com acetonitrila (10 ml). A solução final foi então filtrada (Millipore 0,45 μ m) e injetada no cromatógrafo. A fase móvel (1,0 mL.min⁻¹) consistiu de acetonitrila/água (60:40 v/v), acidificada com ácido acético até pH aparente de 4,5. O α -bisabolol foi detectado a 207 nm com um tempo de retenção de 11 min.

Curvas analíticas para o fármaco em acetonitrila foram obtidas entre 2-25,00 µg/mL, apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,99. O método em CLAE foi previamente validado de acordo com o ICH (2005) (Terroso, 2010).

4.3.3.2 *Determinação do diâmetro de partícula e distribuição granulométrica*

A determinação do diâmetro e da polidispersão das partículas em suspensão foi realizada através de difratometria de laser (Mastersizer® 2000, Malvern) e espalhamento luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS, Malvern).

Para as análises de difratometria de laser, as amostras foram adicionadas no compartimento de dispersão de líquidos, contendo água destilada, a temperatura ambiente e os resultados determinados através da média de três repetições leitura. Para as análises foi utilizado um espectro de leitura compreendido entre 0,02 – 2000 µm. O diâmetro baseado no volume (D[4,3]) foi utilizado como parâmetro para diâmetro médio de partículas. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada [d (0.1), d (0.5) e d(0.9), respectivamente] também foram realizadas. Por meio dessas medidas foi calculado o *span*, definido como uma medida da dispersão granulométrica, sendo utilizada a Equação 1 (Chen e Davis, 2002):

$$\text{span} = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (\text{Equação 1})$$

Para as análises por espalhamento de luz dinâmico, as amostras foram preparadas através da diluição de 500 vezes em água Milli-Q previamente filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HP). Através desta técnica foram determinados o diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI).

4.3.3.3 *Análise do potencial zeta*

O potencial das suspensões contendo os nanocarreadores foi determinado através de Zetasizer® nano-ZS, modelo ZEN 3600 (Malvern, EUA) que utiliza metodologia de mobilidade eletroforética. Essa determinação

foi realizada após preparação da formulação e diluição de 500 vezes em solução de NaCl 10 mM (filtrada em filtro 0,45 µm, Millipore Millex-HP). Os resultados obtidos representam a média da medida de três lotes.

4.3.3.4 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro calibrado, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média da medida de três lotes.

4.3.3.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade das suspensões foi determinada usando um viscosímetro vibracional (SV-10, A&D Company, Japan). Após a preparação das formulações as medidas foram realizadas diretamente à temperatura de 25 ± 0.5 °C.

4.3.3.6 Determinação do número de partículas

A determinação do número de partículas foi realizada através da técnica de turbidimetria (Poletto *et al.*, 2008). As suspensões contendo as nanopartículas foram analisadas por espectrofotometria, a fim de se determinar a turbidez τ (cm^{-1}) das suspensões, de acordo com a Equação 2:

$$\tau = \frac{1}{b} \ln(10) \times A \quad (\text{Equação 2})$$

onde, $b(\text{cm})$ é o caminho ótico da célula e A é a absorvância medida.

Em uma determinada diluição da amostra, pode-se relacionar a turbidez com o diâmetro (cm), concentração de partículas N (partículas cm^{-3}) e com a eficiência de extinção (W) (Equação 3)

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 \times N \times W \quad (\text{Equação 3})$$

W é uma função do tipo $W(x,m)$, onde x é o parâmetro relacionado ao tamanho e definido como $x = \pi d / \lambda$, onde λ (cm) é o comprimento de onda incidente no meio dispersante. O parâmetro m é o índice de refração relativo da partícula. Em um índice de refração fixo, W pode ser obtido de acordo com a equação abaixo (Equação 4):

$$W = K \times 2 \ln(10) \times \alpha \times d / 3 \text{ (Equação 4)}$$

onde, d (cm) é o diâmetro de partícula, α (g cm^{-3}) é a densidade da partícula e K ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) é o coeficiente de extinção da amostra, que pode ser calculado utilizando a Equação 5:

$$\tau = \ln(10) \times K \times c \text{ (Equação 5)}$$

onde, c (g cm^{-3}) é a concentração da amostra.

Desta forma, as suspensões contendo nanopartículas foram diluídas numa faixa de concentração que obedeça a Lei de Lambert-Beer. As amostras diluídas foram analisadas em 395 nm e os diâmetros d (Equação 4) foram experimentalmente determinados por difratometria de laser.

4.3.4 Estudo de gradiente de densidade

O estudo de gradiente de densidade consiste na separação de diferentes estruturas e determinação da densidade das mesmas. Para tanto, inicialmente foi preparada uma solução de sílica (Percoll[®]) 54% em cloreto de sódio 0,15 M. 400 μL das formulações de nanocápsulas (NC Branca, α -BNC1, α -BNC10 e α -BNC16), além de nanoemulsão de α -bisabolol (α -BNE16) e nanoemulsão de TCM (NE16) foram adicionadas em 19,6 mL dessa solução de Percoll[®]. Para induzir a separação das partículas, foi realizada ultracentrifugação (18.500 rpm) por 60 minutos à temperatura de 20°C. A densidade das partículas obtidas foi determinada através de uma curva polinomial, previamente realizada com marcadores de densidade (DensityMarkerBeads[®]), os quais apresentam densidade conhecida (Jager *et al.*, 2009; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2011).

4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O estudo de calorimetria exploratória diferencial foi realizado em equipamento *TA Instruments*, modelo Q20, com nitrogênio líquido ultrapuro, em vazão de 50 mL/min, em panelinhas de alumínio herméticas. As análises foram realizadas para as matérias primas (analisadas como recebidas): PCL, TCM, α -bisabolol, MS (monoestearato de sorbitano), mistura binária (entre TCM e α -bisabolol), mistura binária (entre TCM e MS) e mistura ternária

(TCM, α -bisabolol e MS). Foram pesados cerca de 10 mg de cada amostra. As amostras foram submetidas a um ciclo de aquecimento (de -80°C a 100°C), com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

4.3.6 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando-se células de Franz automatizadas. Para realização deste experimento foram utilizadas membranas de acetato de celulose 25 mm (*cut off* 14.000 Da) (Sigma-Aldrich®). As membranas foram previamente hidratadas com água destilada a 32°C durante 30 minutos. A condição *sink* no compartimento receptor foi obtida com meio constituído de uma mistura etanol:água (50:50, v/v). O volume de coleta foi de 1,8 mL com tempos de coleta de 10, 20, 30, 40, 60, 120, 240, 360, 720 e 1440 min. O banho foi ajustado para uma temperatura 32°C e a agitação magnética para 400 rpm. A amostra avaliada foi uma alíquota de suspensão de nanocápsulas ou emulsão do α -bisabolol (fármaco livre) (300 μL), sendo essa aplicada na membrana através de um dispositivo especial para amostras líquidas. Após as 24 horas de diálise, as amostras coletadas do meio receptor foram analisadas utilizando a metodologia de CLAE anteriormente citada. Para cada formulação foram utilizadas 3 células de difusão.

A modelagem matemática (MicroMath Scientist®, version 2.01, St. Louis, MO, USA) foi utilizada para analisar os perfis de liberação do α -bisabolol utilizando os modelos monoexponencial e biexponencial (Fontana *et al.*, 2009).

4.3.7 Avaliação do potencial irritante

O teste de HET-CAM foi realizado visando a avaliação do potencial irritante das formulações α -BNC10, α -BCT10 e α -BNC10. Este teste permite o estudo dos efeitos imediatos que seguem a aplicação de substâncias teste sobre a membrana córionialantóide (CAM) de ovos embrionados de 10 dias (Luepke and Kemper, 1985). Esses efeitos tratam-se principalmente de modificações vasculares e também interações com as proteínas, que representam as duas principais características em irritações

oculares. A CAM é uma membrana extra embrionária altamente vascularizada, e por esse motivo possibilita o estudo dos efeitos agudos de produtos, classificando-os de não-irritante a irritante severo. O ensaio foi baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação), após 5 minutos da aplicação das formulações sobre a membrana córneoalantóide. Foram utilizados dois controles positivos (NaOH 0.1M e LSL 1%) para coagulação e hemorragia, respectivamente. O cálculo do potencial irritante foi realizado de acordo com a equação 6, e as formulações classificadas de acordo com a Tabela 8:

$$IP = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-v) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300} \quad (\text{Equação 6})$$

Tabela 8: Classificação do grau de irritação de acordo com o potencial irritante.

Potencial irritante	Grau de irritação
0 – 0,9	Não irritante
1 – 4,9	Irritação fraca
5 – 8,9	Irritação moderada
9 – 21	Irritação severa

4.3.8 Estudo de permeação cutânea

Os estudos de permeação cutânea foram realizados utilizando-se células de Franz automatizada (Microetteplus, Hanson). Para realização deste experimento foram utilizadas como membrana a pele abdominal de suíno, com espessura entre 1,4 e 2,0 mm. O meio utilizado constituiu-se de uma mistura etanol:água (50:50, v/v), e foi escolhido para garantir a solubilidade do α -bisabolol. Sobre cada membrana aplicou-se a amostra de suspensão de nanocápsulas ou emulsão do α -bisabolol (fármaco livre) (300 μ L), sendo essa aplicada na membrana através de um dispositivo especial para amostras líquidas. Ao final de cada ensaio, realizou-se a coleta do meio receptor e determinou-se a quantidade de α -bisabolol retido no estrato córneo, epiderme e derme. Para a determinação da quantidade de ativo retido no estrato córneo, derme e epiderme, as membranas (n=6) foram retiradas das células de Franz. Inicialmente, o excesso de formulação ainda

remanescente na superfície da pele foi removido com o auxílio de algodão. Em seguida, procedeu-se a técnica de *tape stripping*, objetivando a remoção do estrato córneo. Para isto, foram utilizadas 18 fitas adesivas (Scotch[®], 3M) para cada amostra de pele. Estas fitas foram acondicionadas em tubo de ensaio, seguida da adição de 15 mL de acetonitrila para extração do ativo.

Após a retirada do estrato córneo, foi realizada a separação da epiderme e derme mediante a submersão da pele em água ultrapura a 55 °C por 60 segundos. A epiderme foi então removida com auxílio de uma espátula. Esta foi acondicionada em tubo de ensaio juntamente com 5 mL de acetonitrila. A derme foi fracionada em pequenos pedaços, com auxílio de bisturi, e colocada em tubo de ensaio contendo 10 mL de acetonitrila. A seguir, foi realizada a extração das formulações contidas no estrato córneo, epiderme e derme, mediante agitação em vórtex por 1 minuto e banho de ultrassom por 30 minutos à temperatura de 30 °C. As amostras foram filtradas e analisadas utilizando a metodologia de CLAE anteriormente citada.

4.3.9 Manutenção das linhagens celulares

A linhagem celular de glioma de rato C6 (derivado de glioma induzida em ratos por N-nitrosometiluréia) e de melanoma humano (SK-MEL-28) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, EUA). As células foram cultivadas e mantidas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) contendo antibióticos penicilina / estreptomicina 0.5U/ml, e suplementada com 5% (v / v) de soro fetal bovino (FBS). As células foram mantidas a uma temperatura de 37 °C, a umidade relativa mínima de 95%, e uma atmosfera de 5% de CO₂ no ar. Todos os experimentos ao longo deste estudo foram realizados no soro DMEM suplementado.

4.3.10 Exposição

Para os experimentos com linhagens celulares, a preparação do α -bisabolol livre foi procedida dissolvendo-se o mesmo em dimetilsulfóxido estéril (DMSO; Sigma). As nanocápsulas foram preparadas como descrito no item 2.1. Nanocápsulas brancas (NC branca) (com o núcleo lipídico

constituído exclusivamente por triglicerídeos cáprico e caprílico) foram utilizadas como formulação-controle dos constituintes das nanocápsulas, aplicando-se volume equivalente ao maior volume da formulação de nanocápsulas utilizada. As placas foram semeadas com cada uma das linhagens (glioma ou melanoma) e após atingir semiconfluência as culturas foram expostas por 24 h às formulações. Células controle foram tratadas com o veículo, ou seja, 1,0% de DMSO ou com nanocápsulas sem α -bisabolol. Ainda como controle, células foram mantidas sem tratamento.

4.3.11 Avaliação da viabilidade celular de células de glioma e melanoma

O ensaio de MTT fornece uma medida quantitativa das células com mitocôndrias metabolicamente ativas através da redução mitocondrial de um sal tetrazóliobrometo, o MTT ([3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio]) a cristais de formazan, intensamente coloridos, no interior das células, cuja absorção pode ser determinada por análise espectrofotométrica (Liu *et al.*, 1997).

Células de glioma foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^3 por poço e após atingida a semiconfluência, as culturas foram tratadas. Culturas controle foram tratadas com DMSO ou nanocápsulas brancas. Após 24 h de tratamento, o meio de cultura contendo o fármaco foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com 100 μ l de PBS. Após a remoção do PBS, 90 μ l de meio de cultura e 10 μ l de MTT foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas durante 3 h e o meio foi em seguida removido. Os cristais de Formazan foram dissolvidos em 100 μ l de DMSO e a absorvância foi lida em leitor de placas de ELISA a 490 nm. Esta absorção é linearmente proporcional ao número de células vivas com mitocôndria ativa.

Paralelamente, as células de melanoma foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 20×10^3 por poço e após atingida a semiconfluência, as culturas foram tratadas. Após 24 h de tratamento, o meio de cultura contendo o fármaco foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com 500 μ l de PBS. Após a remoção do PBS, 450 μ l de meio de

cultura e 50 µl de MTT foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas durante 3 h e o meio foi em seguida removido. Os cristais de Formazan foram dissolvidos em 300 µl de DMSO e a absorvância foi lida em leitor de placas de ELISA a 490 nm.

4.3.12 Avaliação da captação celular em células de melanoma

As células da linhagem SK-MEL-28 foram tratadas com a formulação de nanocápsulas ligada à rodamina B nas doses de 10, 25, 50 e 75µM. Foram então mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo as nanocápsulas foi removido e os poços lavados duas vezes com PBS. Adicionou-se, então, uma solução de tripsina-EDTA para que as soltar as células do fundo da placa. O líquido foi recolhido em eppendorfs e as placas lavadas novamente com PBS, recolhido nos mesmos tubos. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência e também lidas em citômetro de fluxo munido do filtro PE.

4.3.13 Gerenciamento de resíduos

Os resíduos gerados foram classificados como grupo A e grupo B. Aqueles contendo carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação correspondem ao grupo A, e, por sua vez, substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente foram classificados como grupo B (COSAT-UFRGS, Plano de Gerenciamento de Resíduos, 2007).

A identificação dos resíduos do Grupo A foi feita por meio da inscrição “Resíduo Infectante ou Biológico” com a simbologia correspondente, em saco plástico branco, impermeável, resistente e devidamente rotulado.

Os resíduos do grupo B foram devidamente armazenados em bombonas plásticas e/ou frascos de vidro âmbar com bocal largo. Os mesmos foram identificados e acondicionados de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT, 2007. A empresa responsável pelo recolhimento e descarte final dos resíduos do grupo A é a empresa Aborgama do Brasil.

CAPÍTULO 1. O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 63 a 81, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Trata-se do desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo α -bisabolol, estudo da influência da modificação do núcleo oleoso sobre a liberação e sobre o efeito citotóxico em linhagem celular de glioma (C6).

CAPÍTULO 2. O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 83 a 107, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Trata-se de avaliação *in vitro* da permeação cutânea de nanopartículas contendo α -bisabolol, atividade citotóxica e captação celular em linhagem de melanoma (SK-MEL-28).

CAPÍTULO 3. Avaliação da atividade gastroprotetora de formulações nanoparticuladas em modelos *in vivo* de indução de úlceras por etanol e indometacina.

Estudos anteriores descreveram que a administração oral de α -bisabolol foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra úlceras induzidas por etanol (Rocha *et al.*, 2010). Adicionalmente, trabalho de nosso grupo de pesquisa evidenciou que nanocápsulas e nanopartículas lipídicas brancas apresentaram efeito gastroprotetor em ratos frente a úlceras induzidas por etanol, de maneira dependente de sua fração volumétrica (Bueno *et al.*, 2013). A partir dessa premissa, levantou-se a hipótese de que poderia haver um efeito combinado, através de nanoencapsulação do α -bisabolol sobre a propriedade de proteção da mucosa gástrica contra o processo de ulceração causado por ingestão de etanol e indometacina.

3.1. Objetivo

Avaliação da atividade antiulcerosa de formulações nanoparticuladas contendo α -bisabolol em modelos *in vivo* de indução de úlceras por etanol e indometacina.

3.1.1. Objetivos específicos:

- Avaliação do efeito gastroprotetor *in vivo* frente à úlceras induzidas por etanol.
- Avaliação do efeito gastroprotetor *in vivo* frente à úlceras induzidas por indometacina.
- Análise do tecido gástrico através de microscopia eletrônica de varredura.
- Análise histopatológica do tecido gástrico.
- Avaliação da propriedade mucoadesiva das formulações.

3.2 Artigo científico:

Gastroprotective effects of polymeric nanocapsules and cocoa-theospheres containing α -bisabolol in rats

Thatiana Terroso¹, Kelly Bueno Condotta¹, Francisco Noé da Fonseca¹, Denise Soledade Jornada¹, Greice Oliveira Ferreira¹, Joel Henrique Ellwanger^{3,4}, Juarez Alaor Schmidt³, Adriana Raffin Pohlmann^{1,2} Sílvia Stanisçuaski Guterres^{1,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Histologia e Patologia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence: Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
nº 2752, Av. Ipiranga, Bairro Santana, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

Tel. +55 51 3308 5215

Email: silvia.guterres@ufrgs.br

Abstract: The use of nanocarriers becomes a promising alternative to develop a pharmaceutical formulation for oral use. It is described that α -bisabolol oral administration is able to protect the gastric mucosa from ethanol-induced ulcer. In this way, the present work describes the development of α -bisabolol-loaded polymeric nanocapsules (α -BNC) and Cocoa-theospheres (α -BCT), aiming oral use for gastroprotection. In order to evaluate the constituent materials effect, blank formulations were prepared omitting the α -bisabolol. Laser diffraction analysis showed only nanometric population and mean diameters ranging from 138 to 216 nm, corroborating dynamic light scattering results. The gastroprotective effect of the formulations were evaluated in rats and the gastroprotective index for the ethanol-induced ulcers were 0.11 for α -BCT, 0.68 for blank-CT, 0.29 for α -BNC, 0.37 for blank-NC and 0.89 for conventional emulsion, α -Bemulsion. Regarding the indomethacin-induced ulcer model, the results were 37.33 for α -BCT, 48.14 for blank-CT, 31.33 for α -BNC, 45.33 for blank-NC and 65.40 for α -Bemulsion. SEM analysis of the stomach mucosa showed a more homogenous and cohesive coating for α -BNC and α -BCT treatments in comparison with the correspondent blank formulations or α -Bemulsion. In histological evaluations, a protection against the tissue damage and a Periodic Acid-Schiff (PAS)-positive increase were observed after the pretreatment with α -bisabolol nanoparticles in ethanol and indomethacin-induced ulcers, respectively. Moreover, the nanoencapsulation enhanced the α -bisabolol retention on gastric mucosa, suggesting the mucoadhesive properties of the nanocarriers. Besides, the drug nanoencapsulation reduced the α -bisabolol dose (30 mg.kg^{-1}) to protect the stomach mucosa.

Keywords: cocoa-theospheres, polymeric nanocapsules, α -bisabolol, gastroprotection.

Introduction

Gastric dyspepsia and peptic ulcers are very common global problems nowadays. It is generally agreed that gastric lesions develop when there is an imbalance between gastroprotective (mucosal barrier and acid juice neutralization) and aggressive factors (gastric acid secretion).¹ The major causes are alcoholism, emotional stress, helicobacter pylori infection and chronic use of drugs – such as non-steroidal anti-inflammatory, bisphosphonates and anticancer agents.^{2,3} The recommended treatment to control gastric ulceration is to inhibit acid secretion. The antisecretory drugs, such as proton pump inhibitors and histamine H₂-receptor blocker, are widely used with benefits, but there are many reports of adverse effects and relapse.^{4,5} On the contrary, herbal drugs, such as from *Zingiber officinale* and *Asparagus racemosus*, can reduce the offensive factors and proved to be safe, better patient tolerance, relatively less expensive and globally competitive.⁶

α -Bisabolol is an oily sesquiterpene alcohol isolated from the essential oil from a variety of plants^{7,8} and it is widely used in dermatological formulations. Regarding the pharmacological effects, previous studies have shown that α -bisabolol is able to protect the gastric mucosa from ethanol-induced ulcer.⁹ Its antioxidant and anti-inflammatory properties are partially responsible for this propertie.^{10,11}

In pharmaceutical concept, soft nanoparticles are usually assembled molecular and/or macromolecular materials having z-average diameters between 50 and 300 nm.¹² The oral administration of soft nanoparticles is an interesting research field since the particles have great interaction with biological surfaces, resulting in an increased drugs bioavailability.¹³ It was demonstrated that the smaller the administrated particle is, the higher the accumulation on biological tissue is.^{14,15} Studies have also demonstrated facilitated bioadhesion of the nanoparticles to ulcerated tissue because the local presence of inflammation and increased mucus production.¹⁴ In this context, the use of nanotechnology to deliver α -bisabolol to stomach tissue appears as an interesting alternative for a new ulcers treatment and prevention.

Different materials, as well as butters and polymers are used to prepare these soft nanoparticles and produce, respectively, solid lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles.^{16,17} Cocoa butter (*Theobroma cacao* L.) has been used as lipid material to produce nanoparticles with excellent physical stability, the so-called cocoa-theospheres.^{17,18,19} For the polymeric nanoparticles production, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is widely employed due to its biocompatibility, biodegradability and mechanical properties.^{20,21}

In a previous work, our research group demonstrated that blank lipid and polymeric nanoparticles exhibited gastroprotective effect in ethanol-induced stomach ulcer model.¹⁸ Based on this finding, the current study was designed to investigate the benefits of adding α -bisabolol as oily component in polymeric nanocapsules and cocoa-theospheres against ethanol and indomethacin-induced stomach ulceration.

Materials and methods

Preparation of the cocoa-theospheres

Cocoa-theospheres (CT) were prepared by high-pressure homogenization technique after a pre-emulsifying step. The cocoa butter (2.0 g), sorbitan monooleate (0.3 g), α -bisabolol (1.0 g) and capric/caprylic triglycerides (0.3 g) were heated at 40 °C (Table 1). Separately, polysorbate 80 (0.6 g) was dissolved in ultrapure water under magnetic stirring at 40 °C. The lipid and the aqueous phases were pre-emulsified at 13,000 rpm for 2 min using an Ultra-turrax T25 (Ika, Germany) to form the primary emulsion. Then, this emulsion was homogenized in a high-pressure homogenizer (Panda 2K NS1001L, Niro Soavi, Italy) with 4 cycles at 500 bar. This formulation presents 4% of soft materials (w/v) and was called α -BCT. As a control formulation for the gastroprotection studies, cocoa-theosphere suspension without α -bisabolol was also prepared replacing the oil by capric/caprylic triglycerides. This formulation was called blank-CT.

Preparation of the polymeric nanocapsules

Nanocapsules (NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymer, as previously reported.²² An organic phase composed of poly(ϵ -caprolactone) (0.1 g), α -bisabolol (0.1 g), capric/caprylic triglyceride (0.1 g) and sorbitan monostearate (0.038 g) were dissolved at 40 °C in acetone (24 mL) and ethanol (3). Separately, polysorbate 80 (0.077 g) was dissolved in ultrapure water (53.2 mL). Then, at magnetic stirring, the organic solution was injected into the aqueous solution. The acetone and ethanol were eliminated and the suspension concentrated under reduced pressure at 40 °C to a final volume of 10 mL. This formulation presents 4% of soft materials (w/v) and was called α -BNC. As a control formulation for the gastroprotection studies, a nanocapsule suspension without α -bisabolol was also prepared replacing the oil by capric/caprylic triglycerides. This formulation was called blank-NC.

Physico-chemical characterization of the formulations

pH analysis

The pH values of the suspensions were measured directly in samples using a potentiometer (B474; Micronal, São Paulo, Brazil) previously calibrated.

Particle size by dynamic light scattering

Measurements of z-average diameters and polydispersity index (PDI) were performed by dynamic light scattering using a Zetasizer ZS (Malvern, UK). The samples were diluted (1:500, v/v) in filtered ultrapure water (Millipore[®], 0.45 µm). To avoid particle selection, no treatment (filtration or centrifugation) was carried out before analyses, which were made in triplicate batches.

Particle size by laser diffraction

The particle size and size distributions were determined by laser diffraction (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). Each sample was injected directly in the wet unit containing about 100 mL of distilled water. The mean diameter represented by volume-weighted mean diameter (D[4,3]) were determined. The span, a parameter to quantify distribution width, was calculated using Equation (1).

$$span = \frac{[d(0.9) - d(0.1)]}{d(0.5)} \quad (1)$$

Where $d(0.1)$, $d(0.5)$ and $d(0.9)$ are the particle diameters by volume at 10%, 50% and 90% quantile.

Zeta potential analysis

Zeta potential measurements were carried out by electrophoretic mobility technique using a Zetasizer ZS (Malvern Instruments, UK). Samples were diluted (1:500, v/v) with 10 mmol L⁻¹ NaCl pre-filtered aqueous solution. To avoid particle selection, no treatment (filtration or centrifugation) was carried out before analysis. The measurements were made in triplicate batches.

HPLC quantification

The total content of α -bisabolol in the formulations was determined by HPLC analysis (Perkin-Elmer S-200, with injector S-200, detector UV-vis, a guard-column and a column Nova-Pak C-18, 150 mm, 4.9 mm, 4 µm, Waters). α -bisabolol quantification was carried out using a mobile phase consisted of acetonitrile/water (85:15, v/v) adjusted to apparent pH 4.5±0.5. Each

suspension (100 µl) was first diluted in water (10 ml), after an aliquot (1 ml) was treated with acetonitrile (10 ml). The HPLC method was validated following the ICH normative (2005).

Viscosity analysis

The viscosity values of the suspensions were measured directly in samples using a vibrational viscosimeter SV-10 (A&D Company).

Particle number density

The particle number density of formulations was determined by turbidimetry.²³ To validate the method each suspension was analyzed using a Cary 50 UV-Vis spectrophotometer (Varian, USA) in a range obeying the Lambert-Bier Law. No drug photon absorption occurred at the chosen wavelength (395 nm) and turbidity τ (cm^{-1}) was calculated using Equation (2).

$$\tau = \frac{1}{b} \ln(10) \times A \quad (2),$$

where b (cm) is the optical cell path length and A is the absorbance.

In a sufficiently diluted sample of spherical particles, τ is a function of the particle diameter d (cm), the particle number density (N) (particles cm^{-3}) and the dimensionless quantity W , which is the extinction efficiency (Equation 3).

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 \times N \times W \quad (3)$$

where W is a function of the type $W(x, m)$, where x is the size parameter defined as $x = \pi d / \lambda$, in which λ (cm) is the incident wavelength in the dispersing medium, and the parameter m is the particle relative refractive index. At a fixed relative refractive index, W can be obtained by Equation (4).

$$W = \frac{K \times 2 \ln(10) \times \alpha d}{3} \quad (4)$$

where d (cm) is the particle diameter (experimentally determined by dynamic light scattering), α (g cm^{-3}) is the particle density and K ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) is the sample extinction coefficient, which can be calculated using Equation (5).

$$\tau = \ln(10) \times K \times c \quad (5)$$

where c (g cm^{-3}) is the sample concentration.

In vivo ethanol induced gastric ulcers

To evaluate *in vivo* gastroprotection of the formulations, male Wistar rats ($n= 8$ to 10) weighing about 200 g were used. Animals were submitted to a 12 hours fasting, with free access to water. This protocol was approved by the Animal Ethics Committee (Protocol # 18965, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil).

For the ethanol ulcer model, protocol described by Raffin and co-workers (2006) was followed. The groups received 30 mg/Kg of α -BCT, α -BNC or the same respective volume of saline or blank formulations (blank-CT and blank-NC) orally 1 hour prior to the administration of ethanol (5 ml/kg, p.o.). It was also prepared as control of free drug, an emulsion of α -bisabolol with 1% of polysorbate 80 (α -B-Emulsion). After 2 hours of the ethanol administration, the animals were sacrificed and the stomachs were removed, opened along the greater curvature and the lesions measured. Ulcer indexes (UI) were calculated according Equation (6).²⁴

$$UI = 10/x \quad (6)$$

where x is the total mucosal area divided by the total ulcerated area.

In vivo indomethacin induced gastric ulcers

For *in vivo* evaluation, male Wistar rats ($n= 8$ to 10) weighing about 200 g were used. Previously to the beginning of the experiment, animals were submitted to a 12 hours fasting, with free access to water. Then, the animals received 30 mg/Kg of α -BCT or α -BNC and the same respective volume of saline, α -B-Emulsion or blank formulations (blank-CT and blank-NC) orally 1 hour prior to the administration of indomethacin (30 mg/kg in 2% of NaCO₃, p.o.). After 6 hours of indomethacin administration, the animals were sacrificed and the stomachs were removed, opened along the greater curvature and the lesions measured. The ulcers were classified in a grade of 0 to 4 according Al-Harbi and co-workers (0= no ulceration, 1= ulceration points, 2= small ulcers until 2.5 mm, 3= ulcers until 4 mm and 4= ulcers bigger than 4 mm).^{25,26}

SEM analysis of the gastric tissue

After the *in vivo* experiment, samples of gastric tissue were collected and fixed by 2.5% glutaraldehyde according to the electron microscopy procedure. Then,

the samples were submitted to ethanol dehydration and acetone transition. Critical point drying was carried out on a Balzers CPD030. The samples were fixed on aluminum stubs and sputtered with gold alloy (Balzers SCD050). The samples were imaged on a JEOL JSM 6060 field emission SEM at 5 KV (*Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*).

Histological analysis of the gastric tissue

Fragments of gastric tissue were also collected to histological analysis. For this, the tissue samples were fixed by 10% buffered formalin and dehydrated in ethanol with crescent concentrations (70% up to the absolute ethanol). Then, the samples were diafanized in xylene and included in histologic paraffin. The blocks were cut at 7 μ m of thickness and the samples were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Periodic Acid-Schiff (PAS). Six cuts of each sample were prepared for the analysis.

Mucoadhesive property of formulations

The samples (α -BNC, α -BCT and α -B-Emulsion) were subjected to washability measurements by a modified Franz diffusion cell (12mm), containing an input and an output in the donor compartment, for the washing liquid (water: ethanol 1:1). In the present work, stomach mucosa was used as membrane. The input was linked to a peristaltic pump (Miniplus 3, Gilson) working at 1.0 mL min⁻¹. Each sample (30 μ l) was spread on stomach mucosa, and after 10 minutes, the media was fluxed at (37°C) over the sample to simulate the removal action of stomach fluid. The washing liquid was collected in different microtubes, filling one microtube each 2 minutes up to 16 minutes and obtaining 8 fractions. The samples were then assayed using HPLC method for α -bisabolol quantification.

Statistical analysis

Multiple comparisons were performed using one-way ANOVA and Tukey as post-hoc test at the probability level of 0.05 using Graph Pad Prism 5.0 Software. The *in vivo* data are shown as mean values \pm standard error mean (SEM).

Results

Characterization of nanoparticles formulations

All formulations were macroscopically homogeneous bluish-white opalescent liquids. The analysis by laser diffractometry showed that median diameters by number [d(0.5)n] were below 120 nm for all formulations, and the volume-weighted mean diameters (D[4,3]) were close to 150 nm for cocoa-theospheres and 200 nm for polymeric nanocapsules. The samples presented lower SPAN value (Table 1), indicating homogeneous systems. According to the dynamic light scattering technique, all formulations had average particle sizes below 200 nm (Table 2). The suspensions presented monomodal size distributions in nanoscopic range and lower PDI values, indicating narrow particle size distributions, corroborating the laser diffractometry data. Zeta potential values ranged from -7.7 to -11.2 mV, indicating that the inclusion of α -bisabolol led to minor alterations in the electric potential of the nanocarriers (Table 2).

Table 1 Particle size by laser diffraction

Formulations	D(0,5)n (nm)	D[4,3] (nm)	Span
Blank-NC	97±1	194±5	1.54±0.1
	7		6
α-BNC	118±	216±3	1.62±0.1
	9		0
Blank –CT	86±5	157±9	1.5±0.04
α-BCT	95±7	148±1	1.13±0.0
		2	7

Abbreviations: [d(0.5)n], number median diameter; (D[4,3]), volume-weighted mean diameter. Blank-NC, blank polymeric nanocapsules; α -BNC polymeric nanocapsules containing α -bisabolol; blank-CT, blank cocoa-theospheres α -BCT, and cocoa-theospheres containing α -bisabolol.

Table 2 Particle size by dynamic light scattering

Formulations	Mean size (nm)	PDI	ζ Potential (mV)
Blank -NC	193 ± 5	0.069 ± 0.02	-11.2 ± 0.9
α-BNC	177 ± 5	0.096 ± 0.05	-7.7 ± 2.7
Blank -CT	139 ± 4	0.118 ± 0.02	-10.4 ± 2.0
α-BCT	136 ± 6	0.118 ± 0.03	-10.3 ± 1.4

Abbreviations: PDI (polydispersity index). Blank-NC, blank polymeric nanocapsules; α -BNC polymeric nanocapsules containing α -bisabolol; blank-CT, blank cocoa-theospheres α -BCT, and cocoa-theospheres containing α -bisabolol.

For all formulations, the pH values were slightly acid, close to neutral. The viscosity was also measured, since formulations with different viscosities may result in a different tissue coating.²⁷ As a result, no significant differences were observed in terms of viscosity for the formulations prepared with the different materials (cocoa-butter and polymer).

The α -bisabolol contents were close to 10 mg.mL⁻¹ for nanocapsule and theosphere formulations (Table 3). The CT formulations presented particle number density values slightly higher than polymer formulations.

Table 3 Physicochemical characterization of formulations

Formulations	pH	Viscosity (mPa.s⁻¹)	Drug content (mg.mL⁻¹)	PND Particles cm⁻³
Blank-NC	6.21 ± 0,5	1.13 ± 0.06	-	6.9 x 10 ¹²
α-BNC	6.03 ± 0,49	1.03 ± 0.02	10.12 ± 0.04	4.5 x 10 ¹²
Blank -CT	6.9 ± 0,38	1.09 ± 0.02	-	8.6 x 10 ¹²
α-BCT	7.11 ± 0,05	1.16 ± 0.05	10.17 ± 0.08	12.7 x 10 ¹²

Abbreviations: PND, particle number density. Blank-NC, blank polymeric nanocapsules; α-BNC polymeric nanocapsules containing α-bisabolol; blank-CT, blank cocoa-theospheres α-BCT, and cocoa-theospheres containing α-bisabolol.

Prevention of gastric ulcers induced by ethanol or indomethacin

As mentioned previously, the present study was designed to investigate the role of nanoencapsulation in NC and CT in improving the protective properties of α-bisabolol against ethanol and indomethacin-induced stomach ulceration. Thus, NC and CT containing and omitting α-bisabolol were also prepared.

Figure 1 shows that the pretreatment with α-BCT (0.11 ± 0.02) resulted in a decrease of ulcer index, being significantly lower than that observed for the saline group (0.87 ± 0.05) (p < 0.001) and blank-CT group (p < 0.01). Pretreatment with α-BNC (0.29 ± 0.09) significantly reduced the ulcer index relative to the saline ulcer group (p < 0.001). The blank-NC pretreatment presented an ulcer index reduction (0.37 ± 0.04) being significantly (p < 0.001) lower than that of the saline group, but significantly equal from α-BNC. The pretreatments with blank-CT formulation (0.68 ± 0.08) and α-B-Emulsion (0.89 ± 0.12) were not able to reduce the ulcer index.

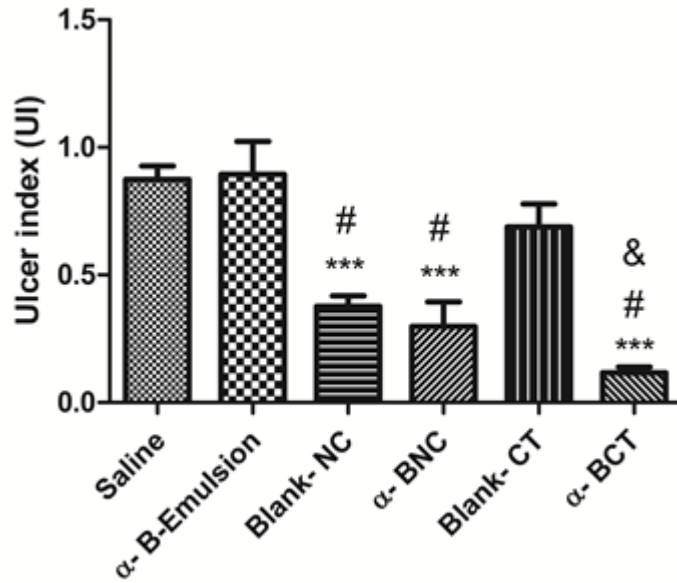


Figure 1 Gastroprotective effect of formulations on ethanol-induced ulcer. α -B-emulsion, NC and CT (30 mg.kg^{-1}). The values are represented as means \pm S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test). Notes: ***Significantly different from the control group ($p < 0.001$). #Significantly different from the α -B-emulsion group ($p < 0.001$). &Significantly different from the blank CT ($p < 0.01$).

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank polymeric nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

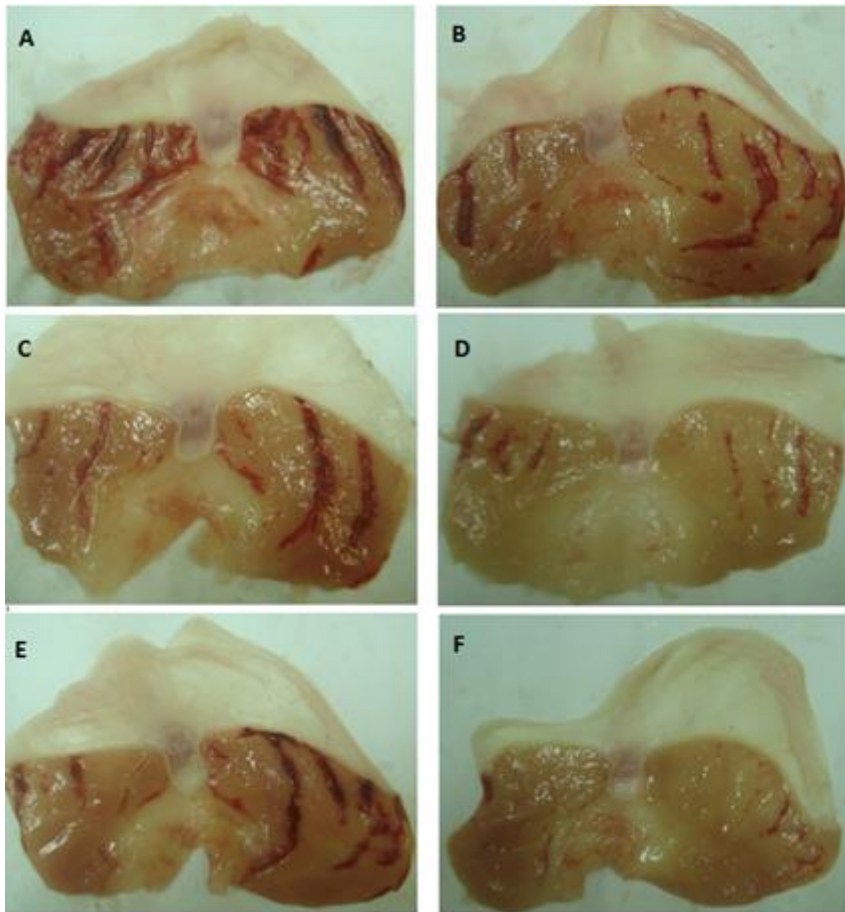


Figure 2 Visual stomach evaluation. Results showed that rats pretreated orally with (**D** and **F**), α -BNC and α -BCT at 30 mg/kg had considerably reduced areas of gastric ulcer formation compared with (**A**) rats pretreated with saline (the ulcer control group) and with (**B**) α -B-Emulsion on the ethanol-induced ulcers. (**C** and **E**) Effect of blank-NC and blank-CT, respectively, at the dose of 30 mg/kg. **Abbreviation:** α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank polymeric nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

Ulcer formation can be induced by a non-steroidal anti-inflammatory agent, as indomethacin, by a systemic pathway. For this reason, a protocol of indomethacin induced ulcer was also tested. Figure 3 presents the results of formulations *in vivo* evaluation of formulations in the indomethacin-induced ulcers protocol. The pretreatment with α -BCT (37.33 ± 1.30) resulted in a decrease of ulcer index, being significantly lower than that of saline group

(58.14 ± 2.75) ($p < 0.001$) and blank-CT group ($p < 0.05$). Pretreatment with α -BNC (31.33 ± 1.64) significantly reduced the area of the ulcer formed relative to the control ulcer group ($p < 0.001$). The blank- NC pretreatment presented a slight ulcer index reduction (45.33 ± 3.55) being significantly ($p < 0.05$) lower than that of the control group. The pretreatments with blank-CT formulation (48.14 ± 2.35) and α -B-Emulsion (65.40 ± 2.65) were not able to significantly reduce the ulcer index in comparison with saline control group.

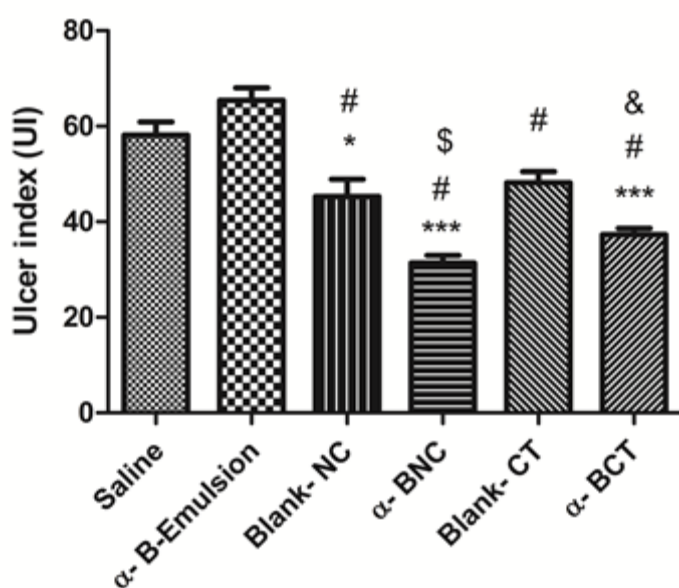


Figure 3 Gastroprotective effect of formulations on indomethacin-induced ulcer.

α -B -emulsion, LNC and CT (30 mg.kg^{-1}). The values are represented as means \pm S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test).

Notes: ***Significantly different from the control group ($p < 0.001$). *Significantly different from the control group ($p < 0.05$). #Significantly different from the α -B-Emulsion group ($p < 0.001$). \$Significantly different from the blank-LNC ($p < 0.01$). &Significantly different from the blank-CT ($p < 0.05$).

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank polymeric nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

SEM analysis of the gastric tissue

Figure 4 shows the stomach tissues after ethanol-induced ulcers observed using a scanning electron microscope. In Figure 4A it is possible to visualize a healthy rat gastric mucosal surface epithelial cells. Figure 4B, 4D and 4F represent a stomach that received saline solution, blank-NC and blank-CT pretreatments respectively. After α -BNC and α -BCT pretreatments (E and G, respectively) a film formation could be observed. In comparison with the coatings promoted by blank formulations, it was observed that α -bisabolol nanoparticles (E and G) are capable to form a more homogenous coating over the mucosa, resulting in the maintenance of original mucosa architecture even under an ethanol administration. The α -B-Emulsion pretreatment (C) resulted in a partial protection of original mucosa structures. The set of results indicates a combined effect of α -bisabolol and nanoparticles in tissue protection, represented by α -BCT and α -BNC.

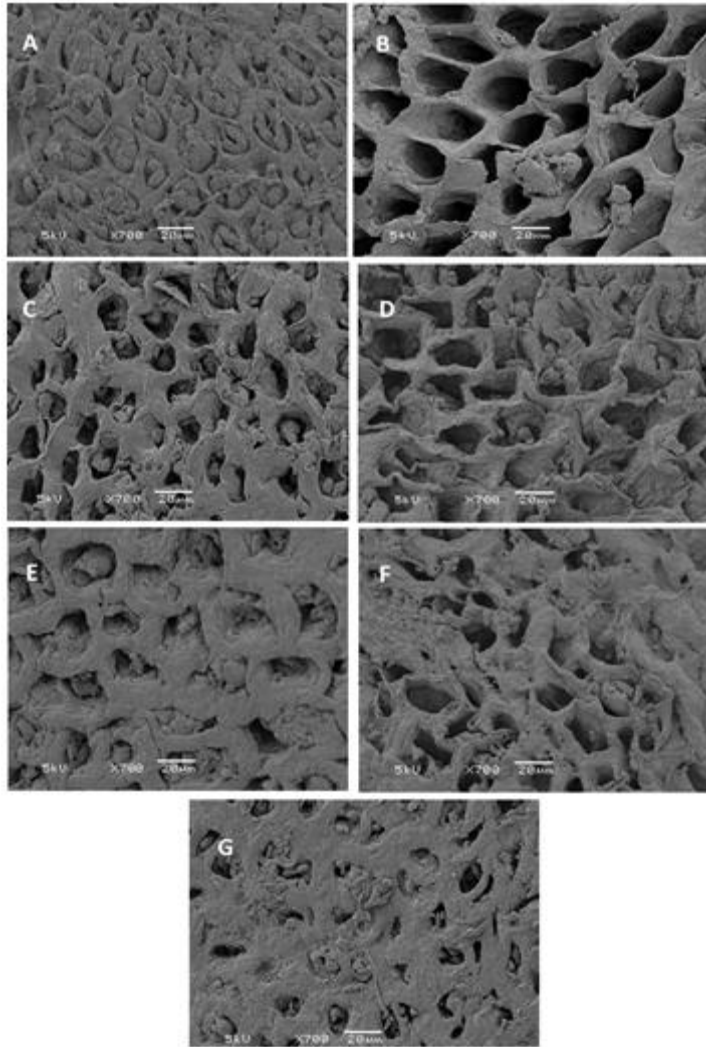


Figure 4 Rat gastric mucosal surface epithelial cells by scanning electron microscope after the ethanol-induced gastric ulcer. (A) Healthy rat gastric mucosal surface (B) after the saline administration (D) after the treatment with blank-NC and (F) blank-CT. α -BNC and α -BCT pretreatments (E and G, respectively). α -B-Emulsion pretreatment (C).

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank-lipid-core nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

Figure 5 shows the results of indomethacin-induced ulcer model. In this protocol, the administration of blank-NC (D), blank-CT (F) and α -B-Emulsion (C) result in partial protection of mucosa, whereas the α -BNC and α -BCT (E and G, respectively) pretreatment show a homogenous and cohesive coating, as

previously observed in the ethanol protocols. Polymeric nanocapsules and cocoa-theospheres containing α -bisabolol are capable to prevent the indomethacin-induced process of ulceration, which includes the inhibition of synthesis of mucus. These results corroborate the results of ulcer index for *in vivo* ethanol and indomethacin-induced ulcer models.

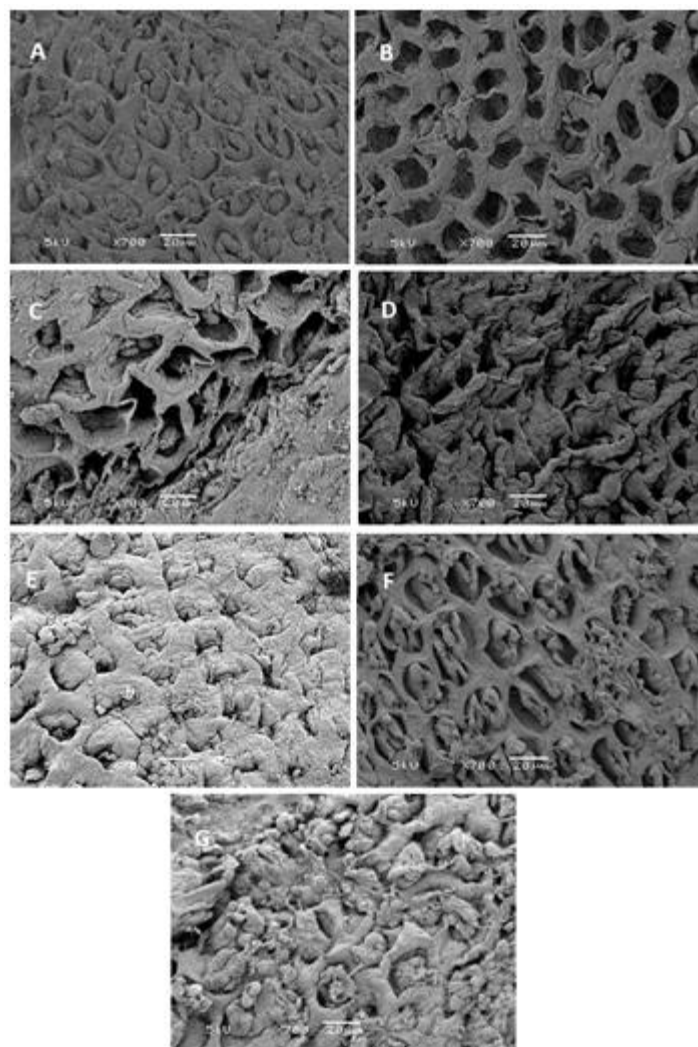


Figure 5 Rat gastric mucosal surface epithelial cells by scanning electron microscope after the indomethacin-induced gastric ulcer. (A) Healthy rat gastric mucosal surface (B) after the saline administration (D) after the treatment with blank-NC and (F) blank-CT. α -BNC and α -BCT pretreatments (E and G, respectively). α -B-Emulsion pretreatment (C).

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank lipid-core nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

Histological analysis of the gastric tissue

The histological aspect of the gastric mucosa epithelium is shown in Figure 6. Photomicrograph of ethanol induced ulcer to rats which received saline pretreatment (A1), showed many gastric mucosa hemorrhagic lesions, mucosa damage and cell infiltration. Pretreatment with α -B-Emulsion (B1) was not able to prevent the injury and it is possible to observe moderate mucosa damage and inflammatory exudate. The administration of blank-NC (C1) results in hemorrhagic lesions, cell infiltration and edema; while blank-CT administration (D1) results in partial protection of mucosa with presence of edema and mucosal damage. Absence of hemorrhage, less infiltration and less edema were observed in the rat gastric mucosa after α -BNC and α -BCT (E1 and F1, respectively) pretreatment. These treatments provided similar photomicrograph aspects than that observed for healthy gastric mucosa (G1 and G2). Furthermore, a protection against histopathological changes caused by ethanol administration was observed after the pretreatment with both α -bisabolol nanocarriers. The pretreatment with α -BNC and α -BCT were able to prevent the disruption of polysaccharides of mucosa, protecting the mucous layer (E2 and F2).

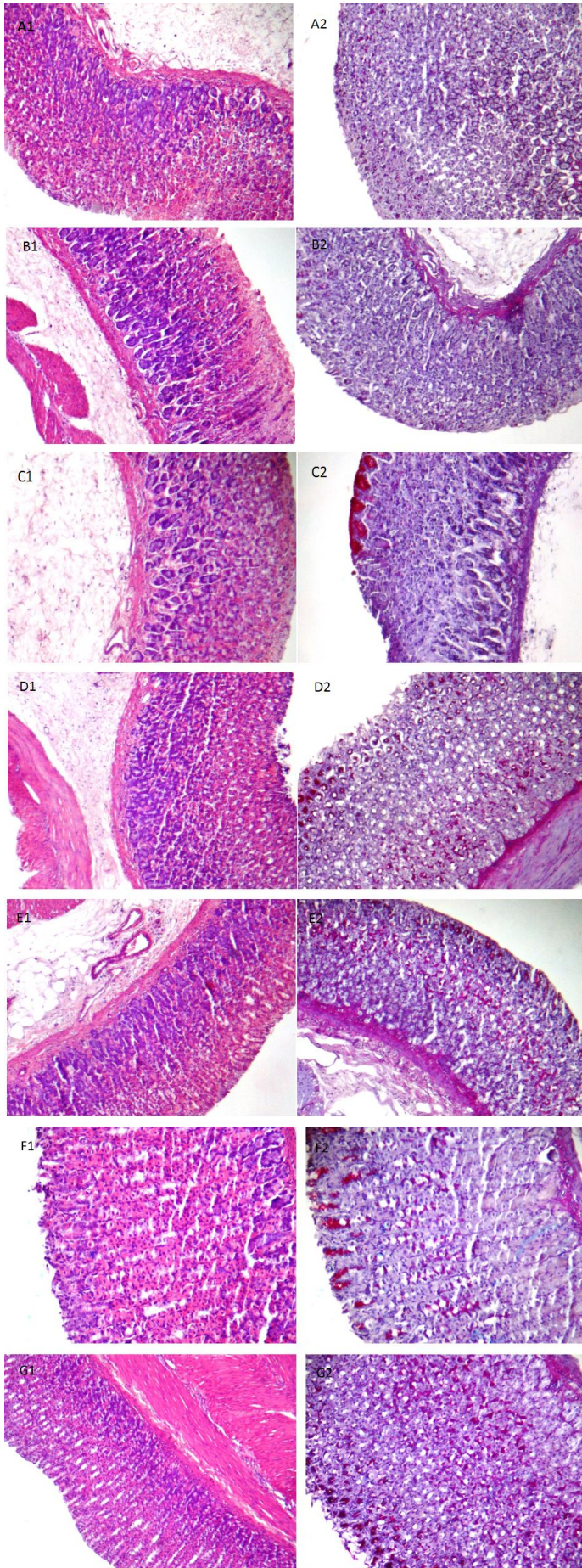


Figure 6 Histological evaluations of formulations on ethanol (EtOH) induced gastric lesions in rats (Hematoxylin and Eosin (1) and PAS (2), average increase). **(A1)** Photomicrograph of EtOH induced rats which received saline showing damaged gastric mucosa. **(B1)** Photomicrograph shows that the pretreatment with α -B-Emulsion was not able to prevent the injury. The administration of blank-NC **(C1)** also result in mucosal damage while blank-CT administration **(D1)** result in partial protection of mucosa. The photomicrographs of α -BNC and α -BCT **(E1** and **F1**, respectively) pretreatment show the similar profile that the healthy gastric mucosa **(G1** and **G2)**.

PAS staining for the evaluation of mucus production shown in **A2, B2, C2, D2, E2, F2** and **G2**.

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank lipid-core nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

The histological analysis of gastric mucosa epithelium after the indomethacin-induced ulcer is presented in Figure 7. In this induction model, no evidence of hemorrhage and low index of cell infiltration and edema were observed in rat gastric mucosa (A1, B1, C1, D1, E1 and F1). The assessment of mucus production shows that the pretreatment with nanoparticle formulations containing α -bisabolol resulted in expansion of a substantial PAS-positive mucous layer.

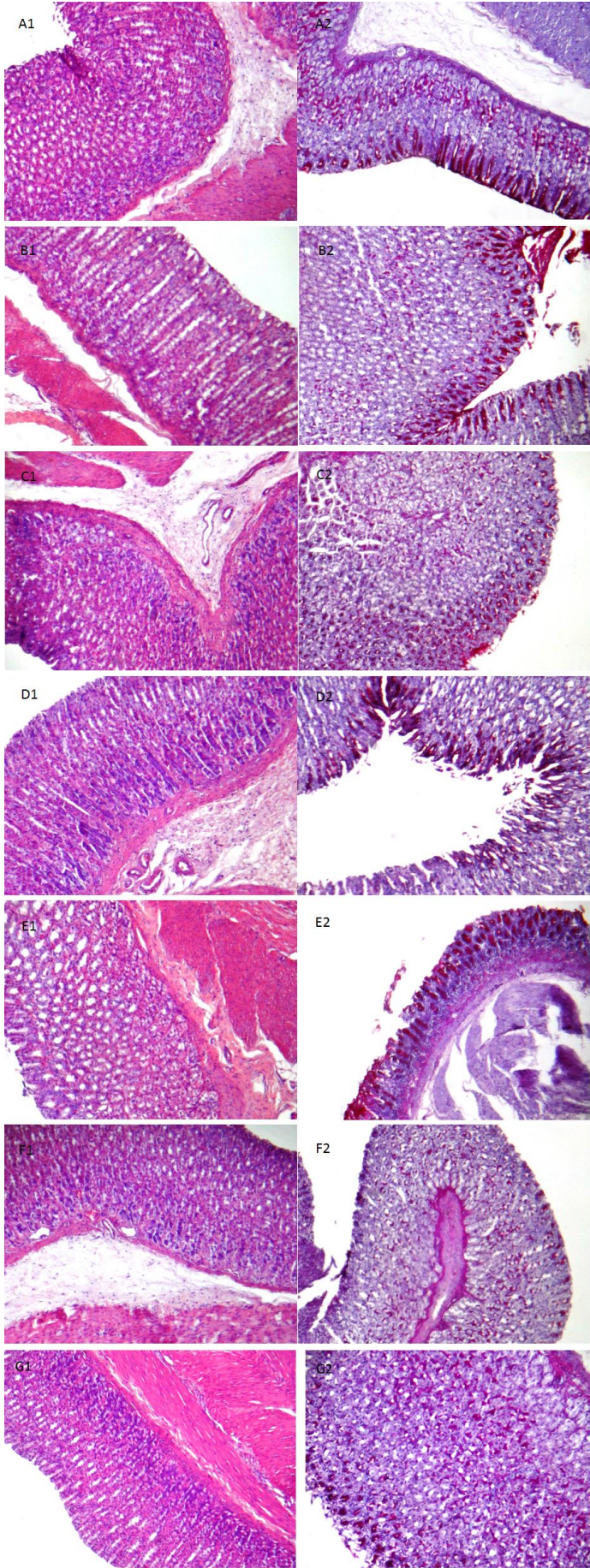


Figure 7 Histological evaluations of formulations on indomethacin induced gastric lesions in rats (Hematoxylin and Eosin (1) and PAS (2), average increase). **(A1)** Photomicrograph of saline pretreated group. **(B1)** Pretreatment with α -B-Emulsion photomicrography. Blank-NC administration **(C1)** and blank-CT administration **(D1)**. Treatment with α -BNC **(E1)** and α -BCT **(F1)**. Healthy gastric mucosa **(G1 and G2)**.

PAS staining for the evaluation of mucous layer shown in **A2, B2, C2, D2, E2, F2 and G2**. The pretreatments with α -BNC and α -BCT present in PAS staining (**E2** and **F2**, respectively) an increase in the mucus production.

Abbreviation: α -BNC, blank-NC: α -bisabolol and blank lipid-core nanocapsules; α -BCT, blank-CT: α -bisabolol and blank cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

Mucoadhesive property of formulations

The retention profiles of the α -bisabolol nanoparticle formulations or α -bisabolol emulsion (α -BNC, α -BCT and α -B-Emulsion) are presented in Figure 8. The results showed that the nanoveiculation cause a significant increase of α -bisabolol retention on the mucosal tissue ($p < 0.001$, ANOVA, Tukey test) after 16 minute of tissue wash. No differences were observed between the α -bisabolol retention conferred by both nanoparticles. At the end of the experiment, the polymeric nanocapsules are able to allow that 91.8% of α -bisabolol amount remain on the membrane tissue. The cocoa-theospheres application result in 91.9% of α -bisabolol retention on the membrane, while the emulsion application result in 78.6% of drug retention.

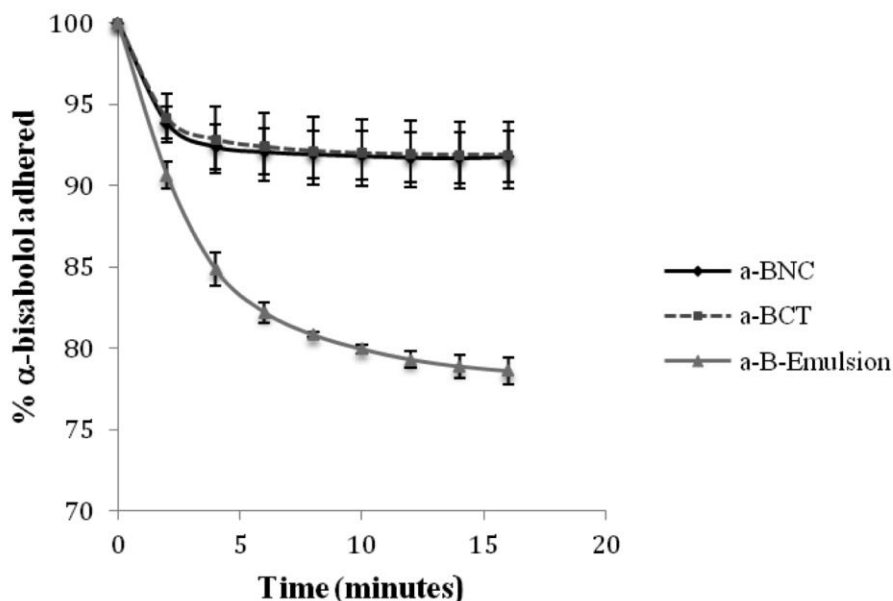


Figure 8 α -bisabolol retention, in nanoparticle formulations (α -BNC, α -BCT) and emulsion (α -B-Emulsion), over stomach porcine mucosal subjected to washing. The values are represented as means \pm S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test).

Abbreviation: α -BNC: α -bisabolol lipid-core nanocapsules; α -BCT: α -bisabolol cocoa-theospheres; α -B-Emulsion: α -bisabolol emulsion.

Discussion

The results showed that cocoa-theospheres formulations presented particle number density values slightly higher than polymer formulations. This increase can be explained due to difference of the average particle size between formulations.

The gastroprotective effect of blank-NC prepared at 4% (w/v) was already described in previously work of our research group¹⁸ with similar ulcer indexes. Bueno and co-workers (2013) evaluated the gastroprotective effect of empty nanocapsules and cocoa-theospheres prepared at two different concentrations of soft materials: 4% and 12% (w/v), and showed that the nanocapsules prepared with 12% presented the lowest ulcer indexes.

In the present work, only nanoparticle formulations with 4% of soft materials were prepared. The results demonstrated that cocoa-theospheres containing α -

bisabolol were effective in preventing gastric ulceration than their respective blank formulation (Figure 1).

Ethanol is a direct contact ulcer agent and the ulcers occur mainly by an increase of permeability and a disruption in mucus barrier.²⁸ Figure 2 shows the aspect of stomachs after the treatments with saline, α -BCT, blank-CT, α -BNC, blank-NC and α -B-Emulsion. The gastric mucosa is a major and the first line of defense, protecting the stomach from external and internal necrotizing agents.²⁹ Previously works showed that nanoparticles can form a film over the mucosa layer, acting as protective physical barrier.^{30, 31} Our results indicate that the formulations can partly prevent the contact of ethanol with the mucus, protecting the stomach mucosa from the gastric secretions. Moreover, the retention drug assay suggests that the better gastroprotection effect of the nanoparticles can be partially explained by their increased mucoadhesion. The higher mucoadhesivity of nanoparticles to the gastric mucosa ensures longer drug residence time in the tissue, local where it develops the main action. Besides, the free α -bisabolol pretreatment resulted in a partial protection of original mucosa structures, suggesting that α -bisabolol also has a mucosal protective effect, independent of its nanoencapsulation.

Endogenous mechanisms can protect the gastric mucosa against various agents by free radicals neutralization, such as those resulting from the action of ethanol.³² The gastroprotective effect of α -bisabolol is probably related to an antioxidant and an anti-inflammatory property, as previously observed by Rocha and co-workers (2010). Presumably α -bisabolol was able to prevent the increase of malondialdehyde, enhance the SOD activity (superoxide dismutase enzyme), besides decrease neutrophil migration to mucosa.¹¹

The gastroprotective activity of α -bisabolol has already been determined using an ethanol-induced ulcers model at the doses of 100 and 200 mg.kg⁻¹.⁹ However, there are no studies that reported the α -bisabolol activity upon indomethacin-induced ulcers. It was largely accepted that the gastric ulcer production by indomethacin is due to the inhibition of the cytoprotective prostaglandins synthesized by COX-1 and COX-2 in the stomach tissue.³³

Thus, α -bisabolol absorption it is necessary, at least partly, to provide a prevention of the mechanism of ulceration. Therefore, the present work demonstrated that nanocapsules and cocoa-theospheres are able to carrier, protect against degradation and deliver α -bisabolol.

According to the literature, nanoscale dimensions favor particles transport across the mucosal epithelium.^{34 - 41} In the present study, drug nanoencapsulation enable a dose reduction to 30 mg.kg⁻¹ in comparison with Rocha and co-worker evaluations, which obtained an efficient therapy from a concentration of 100 and 200 mg.kg⁻¹. Also, two different nanoparticles formulation, produced with different constituents (polymer or butter), were compared and both were capable to protect the gastric mucosa against lesion formation and α -bisabolol nanoparticles reduced the ulceration process in ethanol and indomethacin-induced ulcers protocols.

The assessment of mucus production shows that only the pretreatment with nanoparticle formulations containing α -bisabolol resulted in expansion of a substantial PAS-positive mucous layer, suggesting that for the indomethacin-induced ulcer model, the α -bisabolol nanoparticles are able to prevent the ulcer formation by inducing the synthesis of polysaccharides in the gastric mucosa.

Recently, it has been shown that ROS possess an important role in the pathogenesis of mucosal damages caused by indomethacin, ethanol and other agents besides the inhibition of COX enzymes.^{42, 43, 44, 45} Since the antioxidant and anti-inflammatory properties of α -bisabolol play an important role in its gastroprotective effect, the results suggest that nanoparticles containing this drug enables a longer contact with de mucosa, so it can exert cytoprotective effect preventing gastric ulcer formation, predominantly by its antioxidant property.

Conclusion

Lipid-core nanocapsules and cocoa-theospheres are promising oral drug carriers for α -bisabolol. The formulations showed narrow size distribution and negative zeta potential values. The ulceration process induced by ethanol and indomethacin administration was not significantly prevented in the animals treated with an α -bisabolol-emulsion in the same dose that nanoparticle suspensions. Nanocapsules and cocoa-theospheres containing α -bisabolol were employed as oral pretreatment and presented significant gastroprotective activity in both induced-ulcer models. The nanoencapsulation enables a dose reduction of drug; therefore, carriers in the nanoscale prepared with biocompatible polymers or lipids are a promising technology for development of oral drug delivery system. Besides, these colloidal carriers represent an interesting strategy for gastric protection against ulcers induction factors.

ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledgement to the financial support of CNPq/Brazil, Rede Nanobiotec CAPES/Brazil, INCT-IF CNPq/MCT, FAPERGS, PRONEM and PRONEX-FAPERGS/CNPq.

REFERENCES

1. Hoogerwerf, W.A., Pasricha, P.J., 2001. Agents used for the control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux diseases. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman, C.S., Gilman, B.T.(Eds.), Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1005–1019.
2. Sherwood, L. Human Physiology From cells to Systems. 17th ed. Brooks/Cole; 2010, 973 p.p.
3. Francis, DL. Stomach. In: Hauser, SC. Mayo Clinic Gastroenterology and Hepatology Board Review. 3th ed. Mayo Clinic; 2008. 533 p.p.
4. Martelli, A., Mattioli, F., Mereto, E., Brambilla, C.G., Sini, D., Bergamaschi, R., Brambilla, G., 1998. Evaluation of omeprazole genotoxicity in a battery of in vitro and in vivo assays. Toxicology 30, 19–41.
5. Wolfe, M.M., Sachs, G., 2000. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal disease and stress-related erosive syndrome. Gastroenterology 118, S9–S31.
6. Goel, R.K., Sairam, K., 2002. Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasna*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. Indian Journal of Pharmacology 34, 100–110.
7. Jakovlev, V, Schlichtegroll, A. Von, 1969. On the inflammation inhibitory effect of alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil, *Arzneimittelforschung* 19, 615–616.
8. Jakovlev, V., Isaac., O, Thiemer, K., Kunde, R., 1979. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the

antiphlogistic effects of alpha-bisabolol and bisabolol oxides, *Planta Med.* 35, 125–140.

9. Rocha, N.F.M., Venancio, E.T., Moura, B.A., Silva, M.I.G., Aquino Neto, M.R., Rios, E.R.V., Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M.M., Fonteles, M.M.F., Sousa, F.C.F., 2010. Gastroprotection of (–)-, alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice. the possible involved pharmacological mechanisms. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24, 63–71.

10. Bezerra, S.B., Leal, L.K., Nogueira, N.A., Campos, A.R., 2009. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP+ channels. *J. Med. Food* 12, 1403–1406.

11. Rocha, N.F.; Oliveira, G.V.; Araújo, F.Y.; Rios, E.R.; Carvalho, A.M.; Vasconcelos, L.F.; Macêdo, D.S.; Soares, P.M.; Sousa, D.P.; Sousa, F.C. (–)- Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2011, 44, 455-461.

12. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research.* 2009; 26(5): 1025-58.

13. Umamaheshwari RB, Ramteke S, Jain NK. Anti-Helicobacter pylori effect of mucoadhesive nanoparticles bearing amoxicillin in experimental gerbils model. *AAPS PharmSciTech.* 2004; 5(2): e32.

14. Hassani S, Pellequer Y, Lamprecht A. Selective adhesion of nanoparticles to inflamed tissue in gastric ulcers. *Pharmaceutical Research.* 2009; 26(5): 1149-54.

15. Lamprecht A, Schafer U, Lehr CM. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical Research*. 2001; 18(6): 788-93.
16. Cattani VB, Fiel LA, Jager A, Jager E, Colome LM, Uchoa F, Stefani V, Dalla Costa T, Guterres SS, Pohlmann AR. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 39(1-3): 116-24.
17. Colome L, Raffin R, Assumpcao E, Pohlmann A, Guterres S. Theospheres Based on Theobroma Grandiflorum Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. *Soft Materials*. 2010; 8(2): 72-88.
18. Bueno K, Adorne MD, Jornada DS, da Fonseca FN, Guterres SS, Pohlmann AR. In vivo gastroprotective effect of nanoparticles: influence of chemical composition and volume fraction. *Curr. Pharm Des*. 2013;
19. Kim BD, Na K, Choi HK. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 24(2-3): 199-205.
20. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drugs Target Insights*, 2007; 2:147-157.
21. Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni C. B, Coradini K, Beck R C, Guterres SS. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* . 2013; 10: 623-638.

22. Jager E, Venturini CG, Poletto FS, Colome LM, Pohlmann JP, Bernardi A, Battastini AM, Guterres SS, Pohlmann AR. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2009; 5(1): 130-40.
23. Poletto FS, Jäger E, Cruz L, Pohlmann AR, Guterres SS. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 2008; 28(4): 472-8.
24. Raffin RP, Colome LM, Pohlmann AR, Guterres SS. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006; 63(2): 198-204.
25. M.M. Al-Harbi, S. Qureshi, M.M. Ahmed, S. Rafatullah, A.H. Shah. Effect of Commiphora molmol (oleo-gum-resin) on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice *American Journal of Chinese Medicine*, 22 (1994), pp. 77–82.
26. M.M. Al-Harbi, S. Qureshi, M. Raza, M.M. Ahmed, M. Afzal, A.H. Shah. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of Commiphora molmol in rats *Journal of Ethnopharmacology*, 55 (1997), pp. 141–150.
27. Lehr, C.; Bouwstra, J. A.; Schacht E. H.; Junginger, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int.J. Pharm.* 1992, 78: 43-48.
28. Kauffman, G., 1989. Aspirin induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal model. *Gastroenterology* 96,606–614.

29. Kelly S, Hunter JO. Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa. *Clin Sci (Lond)*. 1990;79(5):425–427.
30. Souto EB, Muller RH. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *International Journal of Cosmetic Science*. 2008; 30(3): 157-65.
31. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2:751–760.
32. Andreo MA, Ballesteros KVR, Hiruma-Lima CA, Machado da Rocha LR, Souza Brito AR, Vilegas W. Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):431–441.
33. De Souza, G.E., Cardoso, R.A., Melo, M.C., Fabricio, A.S., Silva, V.M., Lora, M., De Brum Fernandes, A.J., 2002. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. *Inflammation Research* 51, 24–32.
34. Desai, M.P. et al. (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* 14, 1568–1573.
35. Kumar H, Dharamveer KMK, Saraf AS. Preparation, characterization and in vivo anti-ulcer evaluation of ranitidine-loaded floating microparticles. *Proceedings of the National Conference on Innovations in Drug Delivery and Research*; March 3–5, 2009; Patiala, India.

36. Ramteke S, Jain NK. Clarithromycin-and omeprazole-containing gliadin nanoparticles for the treatment of *Helicobacter pylori*. *J Drug Target*. 2008;16(1):65–72.
37. Veiga F, Fernandes C, Teixeira F. Oral bioavailability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Pharm*.2000;202:165–171. doi: 10.1016/S0378-5173(00)00445-2.
38. Thanou, M., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E. (2001).Chitosan and its derivatives asintestinal absorption enhancers.*Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(S1),S91eS101.
39. Russell-Jones, G.J. (2004) Use of targeting agents to increase uptake and localizationof drugs to the intestinal epithelium. *J. Drug Target*. 12, 113–123
40. Hwa Kim, S. (2005) Folate receptor mediated intracellular protein delivery usingPLL-PEG-FOL conjugate. *J. Control. Release* 103, 625–634
41. Ravindran J, Nair HB, Sung B, Prasad S, Tekmal RR, Aggarwal BB. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential. *Biocheml Pharmacol*. 2010;79(11):1640–1647.
42. Das, D., Bandyopadhyay, D., Bhattacharjee, M., Banerjee, R.K., 1997.Hydroxyl radical is the major cousative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 8–18.
43. Elliot, S.N., Wallace, J.L., 1998. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury.*Canadian Journal of Gastroenterology* 12, 559–568.

44. Smith, S.M., Kvietys, P.R., 1988. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Critical Care Medicine* 16, 892–898.

45. Miura, T., Muraoka, S., Fujimoto, Y., 2002. Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals. *Biochemical Pharmacology* 63,2069–2074.

5. CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível traçar um comparativo do perfil físico-químico e biológico entre dois tipos de nanopartículas contendo α -bisabolol: poliméricas e lipídicas. Todas essas formulações apresentaram distribuição de partículas nanométricas e características físico-químicas estruturais bastante similares (diâmetro médio, potencial zeta, pH e viscosidade).

As nanocápsulas poliméricas desenvolvidas apresentaram controle da liberação do α -bisabolol quando continham os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico na composição do núcleo da partícula. Com a finalidade de melhor entender esse comportamento, foi realizado o estudo de calorimetria exploratória diferencial. Este estudo demonstrou haver uma interação química entre as os óleos, interação esta que pode ser responsável pelo controle da cedência do α -bisabolol. De forma complementar, o estudo do gradiente de densidade evidenciou que a inserção do α -bisabolol no núcleo oleoso acarreta em modificação da densidade das partículas. A diminuição na densidade das formulações ocorreu por estreitamento das bandas com o aumento do α -bisabolol na composição das mesmas, e pode sugerir que haja formação de um núcleo diferenciado nas nanopartículas (diferente daquele apresentado pelas nanocápsulas de núcleo lipídico).

Através de uma análise dos perfis de liberação do α -bisabolol a partir do ensaio de diálise observou-se que as formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados apresentaram um maior controle de liberação quando comparadas com as nanocápsulas poliméricas. A partir da correlação entre os tempos de meia vida de cada formulação com sua respectiva composição lipídica pode-se verificar que o conteúdo lipídico na formulação (como a manteiga de cacau e os triglicerídeos) é responsável pelo controle da liberação do α -bisabolol.

O estudo de permeação cutânea em pele suína não demonstrou diferenças entre as duas estruturas testadas (nanocápsula e carreador lipídico) quando os níveis de α -bisabolol na derme são comparados. No entanto, os carreadores lipídicos nanoestruturados possibilitaram uma maior

retenção do α -bisabolol no estrato córneo, enquanto que as nanocápsulas poliméricas possibilitaram maior quantificação deste na epiderme quando comparados com a emulsão de α -bisabolol não nanométrica. A comparação com os níveis de α -bisabolol encontrados na derme a partir da α -Bemulsão concluiu que ambas nanopartículas possibilitaram uma penetração/cedência mais lenta, enquanto a formulação de α -bisabolol emulsionado disponibilizou uma maior quantidade do mesmo no mesmo intervalo de tempo. Uma liberação controlada torna-se interessante pois possibilita a manutenção dos níveis de ativo durante um período de tempo maior. Uma vez que ambas estruturas permitiram um depósito de quantidades bastante semelhantes de α -bisabolol na derme, mesmo apresentando perfis de liberação diferentes, além de terem apresentado um perfil diferente da α -Bemulsão no estrato córneo (α -BCT10) e na derme (α -BNC10), pode-se sugerir que parte das partículas permeem íntegras. A permeação dos carreadores através do estrato córneo já foi demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa, de forma que nanocápsulas de núcleo composto por triglicerídeos do ácido cáprico e caprilico com monoestearato de sorbitano - de comportamento mais rígido devido ao aumento de viscosidade do núcleo - ficaram retidas na epiderme, enquanto que as nanocápsulas sem monoestearato de sorbitano no núcleo - de comportamento mais flexível - permearam até a derme. No presente trabalho, as formulações avaliadas quanto a sua permeação (α -BNC10 e α -BCT10) apresentavam uma mistura de TCM e α -bisabolol no núcleo, além do monoestearato de sorbitano. No entanto, sugere-se que ambas foram capazes de penetrar até a derme. Isso pode ser devido a uma obtenção de um núcleo diferenciado, de forma que a inserção do α -bisabolol possa evitar o aumento da viscosidade do núcleo, o que poderia explicar a possível permeação de ambas até a derme.

Através do ensaio de HET-CAM foi possível determinar o potencial de irritação das formulações testadas (α -BNC10, α -BCT10 e α -Bemulsão). Todas as formulações se mostraram adequadas para aplicação tópica, sendo classificadas como não-irritantes.

A avaliação do efeito citotóxico do α -bisabolol sobre células de melanoma já está relatado na literatura, de forma que este trabalho buscou

avaliar o efeito da nanoencapsulação do mesmo sobre esta toxicidade. Nesse sentido, elegeu-se a formulação de nanocápsulas poliméricas uma vez que apresentaram perfil de permeação mais adequado para o tratamento do melanoma (deposição nas camadas epiderme e derme). A avaliação da citotoxicidade demonstrou que a nanoencapsulação promoveu aumento do efeito citotóxico, reduzindo o valor de IC_{50} calculado à metade. Ainda, uma vez que a avaliação da captação celular demonstrou que as nanocápsulas estavam presentes no interior das células (através de microscopia e citometria de fluxo), pode-se sugerir que a nanoencapsulação possibilita uma vetorização do α -bisabolol melhor e possivelmente mais rápida para o interior da célula, do que a caminho tradicional através dos *rafts* lipídicos.

Dessa forma, os resultados indicam, a partir da correlação da estruturação de formulação, tempo de meia vida de liberação e eficácia *in vitro*, que a nanoestruturação do sistema é fundamental. Quando comparado o tempo de meia vida no ensaio de liberação da formulação livre com a formulação de nanocápsulas contendo 16 mg/mL, não observou-se diferença significativa. Contudo, esse resultado não refletiu igualdade para o ensaio *in vitro* de viabilidade celular, no qual a eficácia da formulação nanoencapsulada foi superior à formulação livre. Esse resultado sugere que a nanoestruturação do α -bisabolol confere uma maior eficácia provavelmente por melhor internalização da formulação nas células.

Adicionalmente, para as formulações nanotecnológicas, ainda parece haver uma influência da liberação da substância, pois a formulação α -BNC16 apresentou eficácia muito superior ao livre na morte de células de glioma, do que a formulação α -BNC10 sobre as células de melanoma. Contudo, para afirmar essa influência ainda seria necessária uma avaliação das atividades das diferentes formulações sobre uma mesma linhagem tumoral.

Outra atividade biológica para as formulações contendo α -bisabolol que revelou resultado muito interessante foi a prevenção de ulceração estomacal. Quando avaliada a eficácia da formulação livre na prevenção de formação de úlceras induzidas por indometacina (concentração de 10 mg/mL) *versus* as formulações nanoestruturadas (lipídica e polimérica) na concentração de 10 mg/mL, novamente pode-se observar um melhor

desempenho para o α -bisabolol nanoveiculado. Esse dado corrobora os dados do experimento *in vitro* com células de glioma e melanoma indicando a necessidade da nanoestruturação para uma maior eficácia do α -bisabolol.

Embora um trabalho anterior já tenha demonstrado que nanopartículas lipídicas e nanocápsulas poliméricas sejam capazes de conferir proteção frente à ulceração por etanol (Bueno et al., 2013), o presente trabalho apontou uma proteção ainda maior quando essas formulações contêm o α -bisabolol na sua constituição. Além disso, no presente trabalho foi demonstrada a capacidade de proteção das formulações frente uma indução de ulceração por indometacina. Esse resultado aponta uma possível ação sistêmica desempenhada pelas nanopartículas de α -bisabolol somada à proteção mecânica (inferida a partir do teste de indução de ulceração por etanol).

O conjunto dos resultados indica que o perfil de liberação do α -bisabolol nas diferentes formulações pode interferir na eficácia final da formulação, porém não de forma determinante. Com base nos dados obtidos a partir dos 3 capítulos desenvolvidos fica evidente que a nanoveiculação do α -bisabolol é o fator determinante para a diferenciação na eficácia do produto final.

6. PERSPECTIVAS

Avaliação da interação entre o α -bisabolol, triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico e manteiga de cacau por calorimetria exploratória diferencial.

Avaliação do grau de flexibilidade das nanocápsulas poliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados através de microscopia de força atômica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, M.; Ramadan, W.; Rambhu, D.; Shakeel, F. Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin. *Pharmazie*, v. 11, p. 806-811, 2008.

Almeida, J.S.; Lima, F.; Da Ros, S.; Bulhões, L.O.S.; Carvalho, L.M.; Beck, R.C.R. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

Alsarra, I.A.; Ahmed M.O., Alanazi, F.K.; Eltahir, K.E.; Alsheikh A.M.; Neau, S.H. Influence of cyclodextrin complexation with NSAIDs on NSAID/cold stress-induced gastric ulceration in rats. *Int. J. Med.Sci.* v. 4, p. 232-239, 2010.

Alvarez-Román, R.; Barré, G.; Guy, R. H.; Fessi, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 52, n.2, p. 191-195, 2001.

Ammoury, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Dubrasquet, M.; Benita, S. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* v. 8, p.101-105, 1991

Baylac, S.; Racine, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy* v. 13 p. 138–142, 2003.

Beck, R.C.R.; Haas, S.E.; Guterres, S.S.; Re, M.I.; Benvenuti, E.V.; Pohlmann, A.R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. *Química Nova*, v. 29, p. 990-996, 2006.

Behin, A.; Hoang-Xuan, K.; Carpentier, A. F.; Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. v. 361, p. 323-331, 2003.

Bernardi, A.; Braganhol, E.; Jäger, E.; Figueiró, F.; Edelweiss, M. I.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, v. 281, p. 53-63, 2009.

Bernardi, A.; Frozza, L.R.; Jager, E.; Figueiró, F.; Bavaresco, L.; Salbego, C.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Battastini, A. Selective cytotoxicity of indomethacin ethyl Ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *European Journal of Pharmacology*.2008.

Bernhill, R.; Mihm, M.C.; & Elgart, G. Malignant Melanoma in Skin Cancer. The McGraw Hill companies. P. 140-163, 2008.

Bode, C.; Bode, J. C. Alcohol's Role in Gastrointestinal Tract Disorders. *Gastrointestinal Tract Disorders*. v. 21, n. 1, 1997.

Bondy, M. L.; Scheurer, M. E.; Malmer, B.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Davis, F. G.; Il'yasova, D.; Kruchko, C.; McCarthy, B. J.; Rajaraman, P.; Schwartzbaum, J. A.; Sadetzki, S.; Schlehofer, B.; Tihan, T.; Wiemels, J. L.; Wrensch, M.; Buffler P. A. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology. *Consortium. Cancer*, v. 113, p.1953-1968, 2008.

Bowman, K.; Leong, K.W, Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine*, p.117-128, 2006.

Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Review*. v. 54, p. 631–651, 2002.

Brum, T. L.; Fiel, L. A.; Contri, V. R.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. *J. Nanosc. Nanotechn.* v. 14, p. 1-8, 2014.

Bueno, K.; Adorne, MD.; Jornada, D. S.; da Fonseca, F. N.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. In vivo gastroprotective effect of nanoparticles: influence of chemical composition and volume fraction. *Curr. Pharm Des.* 2013.

Bundscherer, A., Hafner, C., Maisch, T., Becker, B., Landthaler, M., Vogt, T. Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines. *Oncol Rep.* v. 19, p. 547–553, 2008.

Calvo, P., Gouritin, B., Chacum, H., Desmaele, D., D'Angelo, J., Noel, J.P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J.P., Couvreur, P. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm. Res.* v.18, p. 1157–1166, 2001.

Campos, A. M.; Diebold, Y.; Carvalho, E. L. S.; Sánchez, A.; Alonso, M. J. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: in Vitro Stability, in Vivo Fate, and Cellular Toxicity. *Pharmaceutical Research.* v. 21 p. 803-810, 2004.

Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v.61, p. 140-157, 2009.

Cattani, V.B.; Fiel, L.A.; Jäger, A.; Jäger, E.; Colomé, L.M.; Uchoa, F.; Stefani, V.; Dalla Costa, T.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p. 116-124, 2010.

Cavaliere, E.; Bergamini, C.; Mariotto, S.; Leoni, S.; Perbellini, L.; Darra, E.; Suzuki, H.; Fato, R.; Lenaz, G. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. *The Febs Journal.* 2009

Cavaliere, E., Mariotto, S., Febrizi, C., Prati, A., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L., Lauro, G., Ciampa, A., Suzuki, H. Alfa- bisabolol, a nontoxic natural

compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004.

Cerdeira, A. M.; Goucha, P.; Almeida, A. J. Hydroxypropil methylcellulose phtalate beads containing a model non-steroid anti-inflammatory drug. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 164, 147-154, 1998.

Chakraborty, S.; Stalin, S.; Das, N.; Choudhury, S.T.; Ghosh, S.; Swarnakar, S. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. *Biomaterials*, v. 10, p. 2991-3001, 2012.

Clark, L. N.; Shin, D. B.; Troxel, A. B.; Khan, S.; Sober, A. J. & Ming, M. E. Association between the anatomic distribution of melanoma and sex. *J. Am. Acad. Dermatol.* v. 56, p. 768-773, 2007.

Corell, J. J. V. *Manual de Dermatologia y Venereologia – Atlas y Texto*, Editorial Medica Panamericana, Madrid. P. 441-469, 2008.

Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Review in Theraphy Drug Carrier Systems* v. 19, p. 99-134, 2002.

Cruz, L.; Fattal, E.; Tasso, L.; Freitas, G.C.; Carregaro, A.B.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Tsapis, N. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 152, p. 370-375, 2011.

Darra E., Abdel-Azeim S., Manara A., Shoji K., Marechal J. D., Mariotto S., Cavalieri E., Perbellini L., Piazza C., Perahia D., Crimi M., Suzuki H. Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and bid. *Biochemical and Biophysics*, v. 476, p. 113-123, 2008.

De-Hong, Y.; Qin, L.; Jing, X.; Chao, F.; Hong-Zhuan, C. Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature. *Biomaterials*, v. 31, p. 2278-2292, 2010.

Elsheikh, M.A.; Elnaggar, Y.S.R.; Gohar, E.Y.; Abdallah, O.Y. Nanoemulsion liquid preconcentrates for raloxifene hydrochloride: optimization and in vivo appraisal. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3878-3802, 2012.

Emerich, D. F.; Thanos, C. G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomol. Eng.*, v. 23, p. 171-184, 2006.

Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Med. Chemistry*, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

Fattal E., Vauthier C., Aynie I., Nakada Y., Lambert G., Malvyc C., Couvreur P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *Journal of Controlled Release*, v.53, (1-3), p. 137-143, 1998.

Fattal, E.; Vauthier, C. Nanoparticles as drug delivery systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, p. 1864-1882, 2002.

Fonseca, C.; Simões, S.; Gaspar, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*. v.83, p. 273-286, 2002.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Amoury, N.; Benita, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 1-4, 1989.

Fitzpatrick, T. B.; Eisen, A. Z.; Wolf, K.; Freedberg, I. M.; Frank Austen, K. *Dermatology in General Medicine*, 6 edição, McGraw Hill, New York, p. 917-940, 2005.

Fontana, M.C.; Coradini, K.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Beck, R.C.R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 254-263, 2009.

Fontana, M.C.; Rezer, J.F.P.; Coradini, K.; Leal, D.B.R.; Beck, R.C.R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v, 70, p. 241-249, 2011.

Francis, D. L. Peptic Ulcer Disease. In: Hauser, S. C. Gastroenterology and hepatology board review. 3. ed. Canada: Taylor & Francis, 2008. Cap. 4, p. 55-66.

Frozza, R.L.; Bernardi, A.; Paese, K.; Hoppe, J.B.; Silva, T.; Battastini, A.M.O.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Salbego, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6, p. 694-703, 2010.

Girolami, V. O Sistema Nervoso Central. In: Contran RS, Kumar V, Collins. Robins Patologia estrutural e funcional. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Giunchedi, P.; Torres, M. L.; Maggi, L.; Conti, B.; Conte, U. Cellulose acetate trimellitate microspheres containing NSAIDs. *Drug Dev. Ind. Pharm*, v. 21, p. 315-330, 1995.

Gonzalez-Rodriguez, M. L.; Maestrelli, F.; Moura, P.; Rabasco, A. M. In vitro release of sodium diclofenac from a central core matrix tablet aimed for colonic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 20 (1) p. 125-131, 2003.

Gonzales, M.; Erdei, E. & Berwick, M. Epidemiology of skin cancer. *Skin Cancer*. The McGraw Hill companies, p. 32-36, 2008.

Guedes, M. M.; Carvalho, A.C.S.; Lima, A. F.; Lira, S.R.S.; Queiroz, S.S.; Silveira, E.R.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Gastroprotective Mechanisms of Centipedic Acid, a Natural Diterpene from *Egletes viscosa* LESS. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 7, p. 1351-1355, 2008.

Guterres, S.S.; Alves, M.P.; Pohlmann, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147–157, 2007.

Guterres, S.S.; Müller, C.R.; Michalowski, C.B.; Pohlmann, A.R.; Dalla Costa, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 11, p. 229-233, 2001.

Guyton, A. C.; Hall, J. E.. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 11. ed. Eua: Saunders, 2005. 1104 p.

Haas, S.E.; Bettoni, C.C.; Oliveira, L.K.; Guterres, S.S.; Dalla Costa, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 34, p. 156-161, 2009.

Hans, M.L.; Lowman, A.M. Biodegradable nanoparticle for drug delivery and targenting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, vol 6, p. 319-327, 2002.

Hasani, S.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Selective Adhesion of Nanoparticles to Inflamed Tissue in Gastric Ulcers. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 5, May, 2009.

Heeba, G. H.; Hassan, M. K. A.; Amin, R. S. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in Rats: role of nitric

oxide and prostaglandins. *European Journal of Pharmacology*, v. 607, p. 188–193, 2009.

Hernandez-Ceruelos, A.; Madrigal-Bujaidar, E.; de LA CRUZ, C. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Letter*, v.135, p. 103-110, 2002.

Hoffmeister, C.R.D.; Durli, T.L.; Schaffazick, S.R.; Raffin, R.P.; Bender, E.A.; Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, p. 1-24, 2012.

Jäger, E.; Venturini, C.G.; Poletto, F.S.; Colomé, L.M.; Pohlmann, A.R.U.; Bernardi, A.; Battastini, A.M.O.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.5, p. 130–140, 2009.

Jainu, M.; Devi, C. S. S. Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, v. 161, p. 262–270, 2006.

Jakovlev, V., Isaac, O, Thiemer, K., Kunde, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of alpha-bisabolol and bisabolol oxides, *Planta Med*, v. 35, p. 125–140, 1979.

Jakovlev, V.; Schlichtegroll, A. V. On the inflammation inhibitory effect of alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil, *Arzneimittelforschung*, v.19, p. 615–616, 1969.

Katzer, T.; Chaves, P.; Bernardi, A.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. Castor oil and mineral oil nanoemulsion: development and compatibility with a soft contact lens. *Pharm. Dev. Technol.* V. 2, p. 232-237, 2013.

Konopka, G.; Bonni, A. Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr. Mol. Med.*, v. 3, p. 73-84, 2003.

Konturek, P.; Brzozowski, T.; Kwiecien, S.; Drozdowicz, D.; Harsch, I.; Meixner, H.; Stachura, J.; Hahn, E.; Konturek, S. Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 451, p. 191-202, 2002.

Kreuter, J.; Shamenkov, D.; Petrov, V.; Ramge, P.; Cychutek, K.; Koch-Brandt, C.; Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target*, v. 10, p. 317-325, 2002.

Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, p. 1-18, 2010.

Lu, Y.; Chen, S. C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 22, p. 1621-1633, 2004.

Luepke, N.P. and Kemper F.H. An alternative to the Draize test. *Food and Chemical Toxicology*. v. 23, p. 287-291, 1985.

Maher, E. A.; Furnari, F. B.; Bachoo, R. M.; Rowitch, D. H.; Louis, D. N.; Cavenee, W. K.; DePinho, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.*, v. 15, p. 1311-1333, 2001.

Marongiu, L.; Donini, M.; Bovi, M.; Pedruca, M.; Vivian, F.; Romeo, A.; Mariotto, S.; Monaco, L.H.; Dusi, S. The inclusion into PLGA nanoparticles

enables α -bisabolol to efficiently inhibit the human dendritic cell pro-inflammatory activity. *J. Nanoparticle Research*, v. 16, p. 2554, 2014.

Martinez, J.C., Otley, C.C. The management of melanoma and nonmelanoma skin cancer: a review for the primary care physician. *Mayo. Clin. Proc.* v. 76, p. 1253–1265, 2001.

Mazon, J. J.; Kantor, G. Radiotherapy in stereotactic conditions (radiosurgery) in malignant brain tumors: clinical research. *Cancer Radiotherapy*, v. 2, p. 215-217, 1998.

Mehnert, W.; Mäder, K.; Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 47, p. 165-196, 2001.

Mousseau, M.; Chauvin, C.; Nissou, M. F.; Chaffanet, N.; Plantaz, D.; Pasquier, B.; Schaerer, R.; Benabid, A. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. *European Journal of Cancer*, v. 29A, p. 753- 759, 1993.

Muller, C.r.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Freitas, L. L.; Silveira, N.P.; Costa, T. D.; Guterres, S. S. Spray-dried diclofenac poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres: Preparation and physicochemical characterization. *Die Pharmazie*, v. 56, p. 864-867, 2001.

Müller, R.H.; Petersen, R.D.; Hommos, A.; Pardeike, J. Nanostructured lipid carriers (NCL) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

Müller, R.H.; Radtke, M; Wissing, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC). *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 43-56, 2004.

Müller, C.R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Freitas, L.; Pesce da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded

polycaprolactone nanocapsules and nanospheres. Preparation and Physicochemical characterization. *Pharmazie*. v. 56, p. 864-867, 2001.

Mutoh, H. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *Am J Physiol*, v. 258, p. 603-609, 1990.

Nakamura, C.; Otaka, M.; Odashima, M.; Jin, M.; Konishi, N.; Horikawa, Y.; Matsuhashi, T.; Watanabe, S. Rolipram, a specific type IV phosphodiesterase inhibitor, ameliorates indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. *Pathophysiology*, v. 9, p. 195-200, 2003.

Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*, v. 42(3), p. 1147-235, 2013.

Niles, M. R.; McFarland, M.; Weimer, B. M.; Redkar, A.; Fu, Y.; Meadows, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Letters*. v. 190, p. 157-163, 2003.

Olinda, T. M.; Lemos, T. L.; Machado, L. L.; Rao, V. S.; Santos, F. A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. *Phytomedicine*, v. 15 (5), p. 327-333, 2008.

Oteroespinar, F.; Anguiano-Igea, S.; Blancomendéz, J.; Vilá-Jato, J. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v.70, p. 35-41, 1991.

Patel, B.D.; Modi, R.V.; Thakkar, N.A.; Patel, A.A.; Thakkar, P.H. Development and characterization of solid lipid nanoparticles for enhancement of oral bioavailability of Raloxifene. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, v. 4, p. 14-16, 2012.

Petrovic, S.; Dobric, S.; Bokonjic, D.; Niketic, M.; Garcia-Piñeres, A.; Merfort, I. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, p. 109-113, 2003.

Pimentel, A.F.; Avaliação do poder antioxidante do chocolate amargo - um comparativo com o vinho tinto. Dissertação de mestrado. UFRGS, 2007.

Piochon, M.; Legault, J.; Gauthier, C.; Pichette, A. Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural α -bisabolol β -d-fucopyranoside and analogues. *Phytochemistry*. v. 70, p. 228-236, 2009.

Pohlmann, A. R.; Fonseca, F. N.; Paese, K.; Detoni, C. B.; Coradini, K.; Beck, R. C. R.; Guterres, S.S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* . 2013; 10: 623-638.

Potrich, F. B. Atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da achillea millefoliu l.: envolvimento do sistema antioxidante. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - *Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba*, 2009.

Pusieux, F.; Barrat, G., Couarraze, G., Couvreur, P., Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker: New York, cap, 16., 1994.

Ramsay, P. T.; Carr, A. Gastric Acid and Digestive Physiology. *Surg Clin N Am*, v. 91, p. 977–982, 2011.

Rao, C. N.; Lakka, S. S.; Kin, Y.; Konduri, S. D.; Fuller, G. N.; Mohanam, S.; Rao, J. S. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin. Cancer Res.*, v. 3, p. 570-576, 2001.

Ravi Kumar, M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Sci.*, v. 3, p. 234-258, 2000.

Ribeiro, A. P. B.; Claro da Silva, R.; Gioielli, L. A.; de Almeida Gonçalves, M. I.; Grimaldi, R.; Gonçalves, L. A. G.; Guenter Kieckbusch, T. Physico chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part I - Chemical composition, solid fat content and consistency, *Grasas y Aceites*, 63 v. 1, p. 79-88, 2012.

Rich, J. N.; Bigner, D. D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 5, p. 430-446, 2004.

Rocha, N. F. M.; Venancio, E. T.; Moura, B. A.; Silva, M. I. G.; Aquino Neto, M. R.; Rios, E. R. V.; Sousa, D. P.; Vasconcelos, S. M. M.; Fonteles, M. M. F.; Sousa, F. C. F. Gastroprotection of (-)-, alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice. the possible involved pharmacological mechanisms. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 24, p. 63–71, 2010.

Rocha, N. F. M.; Oliveira, V.G.; Araújo, R.Y.F.; Rios, V.R.E.; Carvalho, R.M.A.; Vasconcelos, F.L.; Macedo, S.D.; Soares, G.M.P., Sousa, P.D., Sousa, F.C.F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Europ. J. Pharm. Sci.*, v.44, p. 455-461, 2011.

Roney, C.; Kulkarni, P.; Arora, V.; Antich, P.; Bonte, F.; Wu, A.; Mallikarjuana, N. N.; Manohar, S.; Liang, H. F.; Kulkarni, A. R.; Sung, H. W.; Sairam, M.; Aminabhavi, T. M. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J. Control Release*, v. 108, p. 193-214, 2005.

Rooprai, H. K.; Vanmeter, T.; Panou, C.; Schnüll, S.; Trillo-Pazos, G.; Davies, D.; Pilkington, G. J. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 17, p. 613-623, 1999.

Sanchez, J. H. G.; Eisman, A. B.; Ortega, S. S. Patrones de exposición solar y tipos de câncer de piel. *Piel*, v. 21, p. 472-476, 2006.

Santos, V.V.; Pena, C.; Acea, B.; Capdevila, E. F.; Bases Actuales del tratamiento del melanoma cutâneo en estádios I, II y III. *Piel*. v. 19, p. 574-581, 2004.

Savrik, A.S.; Balkose, D.; Ulku, S. Synthesis of zinc borate by inverse emulsion technique for lubrication. *J. Therm. Anal. Calorim.* v. 104, p. 605-612, 2011.

Sinha V.R. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* v. 278, p. 1–23, 2004.

Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, p.726-737, 2003.

Schafer-Korting, M.; Mehnert, W.; Korting, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 59, p. 427-443, 2007.

Schroeter, G; Chaves, L.L.; Engroff, P.; Faggiani, F.T.; Carli, G.A.; Morrone, F.B. Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista HCPA*, v. 28, n. 2, p. 89-95, 2008.

Schwartzbaum, J. A.; Fisher, J. L.; Aldape, K. D.; Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, v. 9, p. 494-503, 2006.

Shah, P. J.; Gandhi, M. S.; Shah, M. B.; Goswami, S. S.; Santani, D. Study of *Mimusopis elengi* bark in experimental gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, n. 2, p. 305-311, 2003.

Silva, P.A.; Martini, V.M.; Oliveira, A.M.C.; Cunha, S.; Carvalho, E.J.; Ruiz, G.T.L.A.; Silva, C.C. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based

thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *European J. Medicine Chemistry*. v. 45, p. 2987-2993, 2010.

Singh, L. P.; Kundu, P.; Ganguly, K.; Mishra, A.; Swarnakar, S. Novel role of famotidine in down regulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 43, 289 – 299, 2007.

Smit, H. J. Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. In: Fredholm, B. B. Methylxanthines Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Berlin Heidelberg, Volume 200, 2011, p. 201-234.

Soehngen, E.C.; Godin-Ostro, E.; Fielder F.G.; Ginsberg, R.S.; and Weiner, A.L. Encapsulation of Indomethacin in Liposomes Provides Protection Against Both Gastric and Intestinal Ulceration When Orally Administered to Rats, *Arth. Rheum.*, v. 31, p. 414-422, 1988.

Solorzano, R. G. L.; Fouet, O.; Lemainque, A.; Pavek, S.; Boccara, M.; Argout, X.; Amores, F.; Courtois, B.; Risterucci, A. M.; Lanaud, C. Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional Theobroma cacao L. Variety from Ecuador, *Plos One*, v. 7, n. 11, e48438, p. 1-11, 2012.

Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

Stefanello, A.E.M.; Riva, D.; Simionatto, L.E.; Carvalho, E.J.; Rulz, G.T.L.A.; Salvador, J.M. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil from *Myrcia laruotteana* fruits. *J. Essential Oil Res.* v. 23, p. 7-10, 2011.

Souto, E.B.; Almeida, A.J.; Müller, R.H. Lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. *Journal Biomedical nanotechnology*, v. 3, p. 1-15, 2007.

Srinath P.; Vyas, S.P.; Diwan, P.V. Preparation and pharmacodynamic evaluation of liposomes of indomethacin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 3, p. 313-321, 2000.

Tan, M. L.; Choong, P. F. M.; Dass, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, v.31 (1), p. 184-193, 2010.

Taylor, E. N.; Webster, T. J. The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. *Int J Nanomedicine*, v. 4, p. 145–152, 2009.

Teysen, S.; Singer, M. V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, n. 4, p. 557 –573, 2003.

Terroso, T. Co-encapsulação de Indometacina/éster de indometacina e Alfa-bisabolol em nanocápsulas poliméricas: efeito citotóxico e seletivo em células de glioma. Dissertação de mestrado. UFRGS, 2010.

Üner, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

Venturini, C. G.; Jäger, E.; Oliveira, C. P.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 375, n. 1-3, 200-208, 2011.

Vilos, C.; and Velasquez, L. A. Therapeutics strategies based on polymeric microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 672760, p. 1-9, 2012.

Whiteman, D. C.; Stickey, M.; Watt, P.; Hughes, M.C.; Davis, M. B.; Green, A. C. Anatomic site, sun exposure and risk of cutaneous melanoma. *J. Clinical Oncology*. v. 24, p. 3172-3177.

Wissing, S. A.; Müller, R. H. Cosmetic application for solid lipid nanoparticles (SLN[®]). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 254, p.65-68, 2003a.

Yamada, T.; Onishi, H.; Machida, Y. Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylcellulose. *Journal of Controlles Release*, v. 75, p. 271-282, 2001.

Zambrano-Zaragoza, M.L.; Mercado-Silva, E.; Gutiérrez-Cortez, E.; Castano-Tostado, E.; Quintanar-Guerrero, D. *Food Science and Technology*. v. 44, p. 1362-1368, 2011.

Zur Mühlen, A.; Schwarz, C.; Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n. 45, p.149-155, 1998.