

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia



AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA DE
HIDROGÉIS DE QUITOSANA CONTENDO
CAPSAICINÓIDES NANOENCAPSULADOS

Luiza Abrahão Frank

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
Disciplina de estágio curricular em farmácia

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA DE
HIDROGÉIS DE QUITOSANA CONTENDO
CAPSAICINÓIDES NANOENCAPSULADOS

Luiza Abrahão Frank

Trabalho de Conclusão
de Curso da Disciplina de
Estágio Curricular em Farmácia

Orientadora: Dra. Sílvia S. Guterres
Co-orientadora: Renata Vidor Contri

Porto Alegre, novembro de 2011

“Assim diz o SENHOR: Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem o forte, na sua força, nem o rico, nas suas riquezas; mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me conhecer e saber que eu sou o SENHOR e faço misericórdia, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o SENHOR.”

Jeremias 9:23- 24

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu termine mais uma etapa da minha vida. Agradeço a Ele pelo dom da vida.

Agradeço ao meu marido, Alejandro G3rman Frank pelo amor, carinho e apoio durante grande parte da minha faculdade e agora no desenvolvimento do meu TCC pela paci4ncia e ajuda.

Agradeço ao meu pai, Marino Abrah3o que sempre priorizou pelo meu estudo e minha educaç3o n3o poupando esforç3os para um dia me ver formada.

Agradeço a minha m3e, Thereza Abrah3o pelo apoio e pelo amor.

Agradeço a minha irm3a, Luciane Abrah3o e ao meu irm3o Gabriel Abrah3o pela paci4ncia quando eu tinha prova e pelos muitos momentos de risadas descontraídas.

Agradeço a minha co-orientadora, Renata Vidor Contri pelo ensino e dedicaç3o durante o desenvolvimento do meu TCC.

Agradeço a minha orientadora, S3lvia Stanisçuaski Guterres pela oportunidade e pela orientaç3o.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a uma pessoa com quem eu compartilho todos os momentos da minha vida, sejam eles alegres, tristes, fáceis ou difíceis. A pessoa que esta sempre ao meu lado me incentivando a lutar para eu conquistar meus sonhos e objetivos e torna os meus dias mais felizes, a ti meu marido amado Alejandro G3rman Frank eu dedico inteiramente esse trabalho.

RESUMO

Os sistemas nanoestruturados estão sendo cada vez mais pesquisados e estudados devido à necessidade cada vez maior de aperfeiçoar a ação de fármacos no organismo. Estes sistemas trazem diversas vantagens, tais como controlar a liberação de fármacos e possivelmente diminuir a irritação de substâncias irritantes quando aplicadas sobre a pele. A capsaicina, um fármaco analgésico usado no tratamento da dor de origem neuropática provoca irritação quando aplicada na via tópica. O uso de formulação comercial desta substância produz irritação nos usuários, motivo pelo qual muitos abandonam o tratamento. Uma alternativa promissora para a diminuição deste efeito indesejável na pele consiste da nanoencapsulação desse fármaco o que poderia aumentar a adesão ao tratamento. Portanto, esse trabalho avalia o poder irritante em humanos dessa nova formulação tópica composta de hidrogel de quitosana contendo nanocapsulas de capsaicina quando comparada com a formulação comercial e com uma formulação semelhante contendo a capsaicina na forma livre (n=19 voluntários). Foram levantados dados qualitativos sobre a intensidade da sensação produzida nos voluntários e dados quantitativos do nível de eritema, pH e taxa de hidratação. Os dados foram avaliados por meio de estatística descritiva e ANOVA para medidas repetidas. Os resultados encontrados demonstram que a formulação desenvolvida com nanocapsula diminui significativamente o efeito irritante nos voluntários quando comparada com a formulação comercial e também se comparada a formulação livre, sem levar a mudanças significativas da hidratação da pele e com diferenças significativas para o pH. Conclui-se também que o veículo inovador proposto composto de quitosana e nanocapsulas poliméricas não apresentou efeito significativo de irritação nos voluntários, apresentando-se como alternativa promissora para aplicação de capsaicina ou outros ativos na pele.

Palavras-chave: quitosana; capsaicina; dihidrocapsaicina; nanocapsulas; irritação cutânea;

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	12
3. Materias e Métodos	15
3.1. Matérias-primas	15
3.2. Equipamentos.....	15
3.3. Métodos	16
3.3.1. Preparação das suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas	16
3.3.2. Caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas	16
3.3.3. Preparação dos hidrogéis de quitosana contendo nanopartículas poliméricas	17
3.3.4. Caracterização dos hidrogéis de quitosana contendo nanopartículas poliméricas	18
3.3.5. Estudo de irritação cutânea.....	19
4. Resultados e discussão	21
4.1. Propriedades da suspensão de nanocápsulas.....	21
4.2. Propriedades das formulações semi-sólidas.....	21
4.3. Irritação Cutânea.....	24
4.3.1. Efeito principal da formulação para o eritema observado.....	24
4.3.2. Efeito combinado entre tempo e formulação para o eritema observado ..	26
4.3.3. Análise descritiva da irritação cutânea dos voluntários.....	28
4.4. Análise do pH e hidratação cutânea.....	28
4.4.1. Controle do pH cutâneo	29
4.4.2. Controle da perda de água transepidérmica.....	31

5. Conclusões.....	33
Referências	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Viscosidade dos géis contendo nanocápsulas	22
Figura 2	Viscosidade dos géis com solução hidroalcolica	22
Figura 3	Distribuição de tamanho da partícula por volume	23
Figura 4	Distribuição de tamanho de partícula por número	23
Figura 5	Medida de eritema para o efeito principal ‘formulação’	25
Figura 6	Análise de eritema para a interação do efeito ‘formulação’ e ‘tempo’	27
Figura 7	Análise do pH para a interação dos efeitos ‘Tempo’ e ‘Formulação’	30
Figura 8	Análise da perda de água transepidérmica para a interação dos efeitos ‘Tempo’ e ‘Formulação’	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de pH e conteúdo de capsaicinóides para as formulações	23
Tabela 2	Estimativas das médias para o efeito principal da formulação (N=19).....	25
Tabela 3	Estimativas das médias de eritema produzido para a interação dos fatores (N=19)	27
Tabela 4	Estimativas das médias para o efeito pH.....	30
Tabela 5	Estimativas das médias para o efeito perda de água transepidérmica.....	32

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas são sistemas carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . (SCHAFFAZICK et. al, 2003). Uma das possíveis vantagens advindas do uso dessas partículas é um tratamento mais efetivo e menos tóxico que o convencional. A nanotecnologia vem sendo proposta como meio para diminuição da irritação e alergenicidade de substâncias após aplicação em pele e mucosas (POPLE et al., 2010; AMORIM et al., 2010; CASTRO et al., 2009; SHAH et al., 2007). A capsaicina, analgésico tópico usado no tratamento de dores de origem neuropática, é uma substância bastante irritante para pele, portando o seu uso pelos pacientes é frequentemente descontinuado (HAYMAN e KAM, 2008). Este ativo, juntamente com a dihidrocapsaicina, foi recentemente nanoencapsulado em partículas poliméricas, provando-se que a encapsulação controla a liberação de ambos capsaicinóides a partir da forma farmacêutica proposta (hidrogel de quitosana) (CONTRI et al., 2010).

Em vista do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da nanoencapsulação na irritação cutânea provocada pelos capsaicinóides em humanos, bem como avaliar a irritação do veículo inovador proposto composto de quitosana. Até o presente momento não se tem conhecimento de testes realizados em humanos provando a diminuição da irritação cutânea devido à nanoencapsulação de ativos. Nesse sentido, o presente trabalho é inovador e busca estudar mais uma vantagem dos sistemas nanoestruturados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, a nanotecnologia vem sendo extensamente pesquisada para aplicação em medicamentos e cosméticos e já se encontra em alguns produtos disponíveis no mercado. Nanoestruturas têm sido descritas na literatura desde a década de 1960 em pesquisas na área de âmbito farmacêutico. Uma das vantagens apresentada pelo uso dessas partículas é um tratamento mais efetivo e menos tóxico que o convencional, uma vez que o ativo administrado tem afinidade pelo alvo específico (órgão, tecido ou célula) (TEDESCO, et al., 2007).

Nanopartículas são sistemas carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanoemulsões e também nanopartículas poliméricas e lipídicas. As nanopartículas poliméricas são representadas pelas nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, que pode adsorver ou reter o fármaco. Elas não apresentam núcleo oleoso em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica. As nanocápsulas por sua vez são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo a substância ativa estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica e é fundamental que tanto o óleo quanto a água sejam não solventes para o polímero (SCHAFFAZICK et. al, 2003).

Quando a substância ativa é associada às nanopartículas, é possível controlar sua liberação e a disponibilidade para exercer sua ação (SOPPIMATH et al., 2001), assim podendo apresentar uma maior eficácia terapêutica. Um dos principais objetivos desse tipo de formulação é manter a concentração do fármaco acima da dose subterapêutica e abaixo da concentração tóxica, por um tempo prolongado (TEDESCO et. al., 2007). As nanocápsulas, devido à presença da parede polimérica, apresentam um grande potencial no controle da liberação de fármacos (CONTRI et al., 2011).

Uma via muito estudada para a aplicação de nanoestruturas é a via cutânea. As nanocápsulas são frequentemente obtidas em suspensão aquosa de baixa viscosidade, motivo pelo qual trabalhos recentes têm se dedicado a incorporação dessas em veículos semissólidos para que a aplicação cutânea seja facilitada (ALVES ET AL., 2007; PAESE ET AL., 2009; TERROSO ET AL., 2009). A pele é considerada o maior órgão do corpo

humano, constituindo 16% do peso corporal. Ela exerce importantes funções para o ser humano, tais como: controle de temperatura, barreira mecânica, controle da perda de fluidos importantes, proteção, absorção de radiação ultravioleta (UV), absorção e eliminação de substâncias químicas, dentre outros (RIBEIRO, 2006). Observa-se, através de análises histológicas, que a pele possui duas camadas básicas: a epiderme e a derme e logo abaixo há uma camada formada por tecido adiposo considerada como uma camada subcutânea, a hipoderme (PUGLIESE, 1996). Muitas são as reações inflamatórias que podem ocorrer na pele dos seres humanos, porém a mais comum é a irritação (Welssa et al., 2003).

Observa-se, devido a aplicação cutânea de ativos nanoencapsulados, um possível controle da permeação cutânea do ativo encapsulado, podendo prolongar a sua ação, uma possível melhora do sensorial e da adesividade a pele, além de uma possível diminuição da degradação do ativo e da alergenicidade e irritação cutânea (GUTERRES et al., 2007). A nanotecnologia vem sendo recentemente proposta como meio para diminuição da irritação cutânea de substâncias (POPLE et al., 2010; AMORIM et al., 2010; CASTRO et al. 2009; SHAH et al., 2007). Castro e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do nanoencapsulamento do ácido retinóico em camundongos. Os animais foram avaliados visualmente, através de escala, quanto a presença de eritema na pele. Esse trabalho demonstrou que o efeito irritante do ácido retinóico diminuiu quando esse foi nanoencapsulado. SHAH e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da nanoencapsulação da tretinoína em pele de coelhos. Os coelhos foram avaliados visualmente através de uma escala de 0 a 4 para características de eritema por 24, 48 e 72 horas após a aplicação das formulações. Este estudo mostrou que o efeito irritante da tretinoína nanoencapsulada diminuiu quando comparada à formulação comercial. POPLÉ e colaboradores (2010) mostraram que o tracolimus, usado no tratamento de dermatite atópica quando nanoencapsulada leva a menos sintomas característicos de irritação cutânea. O estudo foi realizado em coelhos com pele intacta e com pele não intacta. A pomada comercial produziu maiores sintomas de irritação na pele não integra. O gel contendo as nanopartículas diminuiu as características de irritação para esse fármaco. AMORIM e colaboradores (2010) mostraram que a idebenona, um antioxidante, produz menos efeito de irritação nas mucosas quando ele é nanoencapsulado. Até o presente momento não foram

descritos testes provando, em humanos, a diminuição da irritação cutânea devido à nanoencapsulação de ativos.

A capsaicina é um fármaco analgésico usado topicamente no tratamento de dores de origem neuropática como osteoartrite, artrite reumatóide e neuropatia diabética bem como no tratamento sintomático da psoríase (Ziet al., 2008). Tal substância é capaz de provocar irritação quando aplicada sobre a pele. (Sikand et al., 2011). O influxo de cálcio e liberação de neuropeptídeos inflamatórios que ocorrem quando a capsaicina se liga ao receptor específico dos nervos periféricos TRPV1 está associado com as propriedades irritantes que ela possui. Também ocorre a liberação aguda da substância P o que leva a uma hiperalgesia inicial que com a continuidade do tratamento, é seguida por uma depleção de tal substância. Em vista disso, muitas aplicações são necessárias no local da inflamação para que haja uma diminuição da sensibilidade e bloqueio a estímulos dolorosos, o que finalmente resultará em uma dessensibilização (reversível com a interrupção do medicamento) ou lesão irreversível da fibra, dependendo das doses e da duração da exposição (ERIN et al., 2008; HAYMAN e KAM, 2008). As diversas aplicações que devem ser feitas até o indivíduo perceber um alívio da dor e a irritação provocada na pele após a aplicação são causas frequentes de abandono ao tratamento dos pacientes. (BARCELOUX, 2008; KNOTKOVA et al., 2008).

Uma forma inovadora e tecnológica visando diminuir a irritação cutânea provocada pela capsaicina e demais capsaicinóides e diminuir o número de aplicações necessárias, devido ao controle da liberação na pele, é a encapsulação de tais substâncias em nanocápsulas poliméricas (CONTRI et al., 2011). A incorporação desta formulação em um hidrogel com propriedades adesivas a base de quitosana já foi descrita (CONTRI et al., 2010). Observou-se um maior controle da liberação dos capsaicinóides a partir da formulação proposta em relação ao hidrogel de quitosana contendo o fármaco livre. A quitosana vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de formas farmacêuticas diferenciadas, como géis, filmes, microesferas e nanopartículas. Uma das principais aplicações terapêuticas do hidrogel de quitosana é a liberação controlada de fármacos (BERGER et al., 2004). Também é possível que tais hidrogéis aumentem a penetração de substâncias por agirem nas junções entre as células epiteliais (VALENTA et al., 2004).

3. MATERIAS E MÉTODOS

Para realização dos objetivos do presente trabalho, foi necessário obter primeiramente as formulações e realizar a sua caracterização. Então foi realizada a aplicação nos voluntários e a coleta dos dados sobre a irritação provocada. A seguir, descrevem-se os materiais e métodos utilizados para a realização destas etapas.

3.1. Matérias-primas

O Eudragit RS 100® foi obtido da Degussa (Darmstadt, Alemanha), o polissorbato 80 (Tween® 80), da Labsynth (São Paulo, Brasil) e os triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico da Brasquim (Porto Alegre, Brasil). A quitosana foi obtida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), o ácido lático da Via Farma (São Paulo, Brasil) e os capsaicinóides (58,61% de capsaicina e 33,76% de dihidrocapsaicina) da Deg (São Paulo, Brasil). O creme comercial de capsaicina 0,025% (Moment, Aspen) foi obtido em farmácia comercial em Porto Alegre, Brasil. A acetona da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e o etanol (PA F. Maia (São Paulo, Brasil) usado eram de padrão analítico e a acetonitrila (Fairfield, EUA) de padrão HPLC).

3.2. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: CLAE-UV (Série 200 Perkin Elmer); potenciômetro (B474, Micronal); Mastersizer® (2000 Malvern); viscosímetro rotacional (LV DV-II+, Brookfield); rotaevaporador (Buchi); sonda para determinação eritema (Mexameter, CKeletronic), sonda para determinação do pH da pele e (Skin-pH-Meter, CKeletronic) e sonda que avalia a perda de água transepidérmica (Tewameter TM30M, CKeletronic).

3.3. Métodos

3.3.1. Preparação das suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial do polímero pré-formado conforme proposto por Fessi e colaboradores (1989). O polímero Eudragit RS 100[®] (250 mg), os triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (825 uL) e os capsaicinóides (12,5 mg), foram dissolvidos em acetona (67,5mL) sob agitação magnética constante à 40 °C (fase orgânica). A solução orgânica, totalmente solubilizada, foi injetada na fase aquosa composta pelo polissorbato 80 (190 mg) e água Milli[®]Q (53mL), sob agitação magnética constante. A seguir, procedeu-se à evaporação eliminando a acetona e parte da água à pressão reduzida até volume final de 25 mL e concentração final de capsaicinóides de 0,5 mg/mL (0,29 mg/mL de capsaicina e 0,17 mg/mL de dihidrocapsaicina). Foi obtida, da mesma forma, uma suspensão aquosa de nanocápsulas brancas, não contendo fármaco.

3.3.2. Caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas

3.3.2.1. pH

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro (B474 Micronal) diretamente nas dispersões coloidais logo após seu preparo. Os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.2.2. Diâmetro de partícula

As formulações de nanopartículas foram avaliadas utilizando difração de *laser* (Malvern[®] 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido). Essa técnica permite a análise de partículas micrométricas por apresentar uma capacidade de verificar tamanhos de partículas que se encontram dentro de uma ampla faixa. Quanto menor a partícula, menor o ângulo de dispersão. Foi utilizado o índice de refração do polímero formador da parede das partículas, Eudragit RS 100[®]. Os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.2.3. Doseamento dos capsaicinóides

O conteúdo de capsaicinóides foi verificado através de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção no ultravioleta (CLAE-UV). Para isso, as dispersões coloidais foram tratadas com o solvente adequado a fim de extrair o fármaco contido no interior das nanopartículas, através de método previamente validado (CONTRI, 2009). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, a fase móvel uma solução de acetonitrila: água (70:30) e o fluxo de 0,75 mL/min. Os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.3. Preparação dos hidrogéis de quitosana contendo nanopartículas poliméricas

Os hidrogéis de quitosana foram obtidos através da dispersão do polímero (2,5%) na suspensão de nanocápsulas brancas ou suspensão de nanocápsulas contendo o ativo, de forma a obter uma concentração final total de capsaicinóides semelhante à formulação comercial. Então, foi adicionado o ácido láctico (1%) que leva a solubilização das cadeias poliméricas e posterior formação do hidrogel. Após a obtenção dos hidrogéis e incorporação do conservante imidazolidiluréia (0,5%), estes foram adequadamente homogeneizados em gral de porcelana e armazenados em frascos plásticos adequados para semi-sólido.

Como controle do estudo de irritação cutânea, foi obtido também, um hidrogel de quitosana contendo o ativo na forma livre. Para tanto, preparou-se uma solução de capsaicinóides em etanol (30% em água ultrapura), que foi incorporada da mesma forma que os hidrogéis contendo nanocápsulas de modo a se obter concentração semelhante de capsaicinóides. Também se preparou um gel de solução hidroalcolica, porém sem adição de fármaco.

As formulações foram designadas por letra sendo que a letra A representa o gel de quitosana contendo nanocapsulas com capsaicinóides, a letra B representa o gel de quitosana com nanocapsulas brancas (sem capsaicinóides). A formulação C representa a formulação comercial adquirida em farmácia. A formulação D representa o gel de quitosana com solução hidroalcolica 30% sem fármaco, e a formulação E o gel de quitosana com solução hidroalcolica 30% contendo capsaicinóides. Cabe salientar que

foram realizadas medidas no antebraço dos voluntários em área igualmente delimitada onde não foi aplicada nenhuma formulação o qual designamos pelo nome formulação F.

3.3.4. Caracterização dos hidrogéis de quitosana contendo nanopartículas poliméricas

Os hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas (brancas e com fármaco) foram caracterizados em termos de pH, presença de partículas nanométricas, teor de capsaicinóides (quando aplicável) e viscosidade. As formulações contendo solução hidroalcoólica, com e sem fármaco, bem como o creme comercial, também foram caracterizados.

3.3.4.1. pH

Para a determinação do pH foi realizado uma diluição dos hidrogéis em água ultrapura (1:10 p/v). A medida foi realizada em potenciômetro (B474 Micronal), e os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.4.2. Diâmetro de partícula

A presença de nanopartículas nos hidrogéis foi confirmada utilizando difração de *laser* (Malvern[®] 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido). Foram utilizados o índice de refração do polímero formador da parede das partículas, Eudragit RS 100[®], para os géis contendo nanocápsulas e o índice de refração do poliestireno para a formulação comercial. Os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.4.3. Viscosidade

A análise de viscosidade das formulações em função da taxa de cisalhamento foi determinado com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV-II+ provido de *spindles SC4-25*. Para as determinações, as amostras foram acondicionadas em dispositivo Brookfield, acoplado a banho de água termostaticado circulante a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.4.4. Doseamento dos capsaicinóides

O conteúdo de capsaicinóides nos géis foi verificado através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (CLAE-UV) (Perkin Elmer Series 200). Para isso, os hidrogéis passaram por processo de extração com acetonitrila por 2h a 37°C. Após a extração, a fase orgânica foi analisada através de método previamente validado (CONTRI, 2009), e brevemente descrito na seção 2.3.2.4. Os resultados representam a média de três determinações do mesmo lote.

3.3.5. Estudo de irritação cutânea

O estudo da irritação cutânea das formulações teste (gel de quitosana contendo nanocápsulas com capsaicinóides) e dos controles (gel de quitosana com solução hidroalcolica contendo ou não capsaicinóides e gel de quitosana contendo nanocapsulas brancas) foi realizado após aprovação no comitê de ética em pesquisa da UFRGS (protocolo número 21520). Após a apresentação da pesquisa para os voluntários (n=19, idade entre 18 e 45 anos), e da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, os voluntários lavaram os braços e antebraços até a altura do cotovelo com sabão neutro, sem perfume. Posteriormente, foram realizadas a aplicação das formulações e a avaliação da irritação cutânea. Estes passos são descritos a seguir.

3.3.5.1. Aplicação das formulações

As formulações foram aplicadas com espátula plástica, 0,150 g de formulação em área de 30 mm de diâmetro (determinada com auxílio de molde plástico e lápis de olho), obtendo-se uma concentração final de capsaicinóides de 0,01mg/cm² de pele. Foi realizada apenas uma aplicação. As medidas foram feitas em intervalos de 30 minutos durante o tempo de 2 horas. Antes de realizar a primeira medida, a formulação foi retirada com água do antebraço dos voluntários.

3.3.5.2. Avaliação da irritação cutânea

Para a avaliação da irritação foi utilizada uma sonda que determina o eritema (Mexameter, CKeletronic) através de emissão de luz na faixa de absorção da hemoglobina. Os voluntários que participaram do estudo foram encorajados a preencherem uma ficha correspondente à sensação de irritação (em anexo). Essas fichas foram preenchidas no momento em que se procedia da medida do eritema. É importante ressaltar que os voluntários não conheciam quais as formulações estavam sendo aplicadas sobre o antebraço deles. Também foram realizadas medidas com outras duas sondas. (Tewameter TM30M, CKeletronic) que mede o pH da pele e (Skin-pH-Meter, CKeletronic) que avalia a perda de água transepidérmica. Essas medidas foram feitas para acompanhar a manutenção das propriedades da pele dos voluntários durante o experimento.

3.3.5.3. Análise estatística

O teste de irritação cutânea foi realizado envolvendo dois fatores principais: tipo de formulação (5 tipos) e tempo após a aplicação (5 momentos) que podem exercer influência sobre o eritema produzido nos voluntários. Para a análise da influência desses fatores sobre o eritema produzido, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Foi utilizada esta técnica devido ao fato de que as medições ao longo do tempo e dentre as diferentes formulações foram tomadas repetidas vezes nos mesmos voluntários (FLUHR et al., 2001). Por meio desta análise foi avaliado se existem diferenças significativas para o eritema produzido em função do tempo, das diferentes formulações e da combinação do efeito produzido por estes dois fatores simultaneamente.

Para a análise da ANOVA de medidas repetidas, primeiramente foi realizado o teste de esfericidade de Mauchly. Nos casos em que a condição de esfericidade é violada (teste de Mauchly > 0,05), foram utilizadas as correções Huynh-Feld (para estimadores de esfericidade > 0,75) ou Greenhouse-Geisser (para estimadores < 0,75). O modelo de ANOVA foi calculado para cada fator e para a combinação de ambos os fatores. Os testes foram considerados significativos quando o *P-value* do *F-test* fosse < 0,05. Posteriormente, foi realizada uma comparação pareada (*pairwise comparison*) para os modelos ANOVA da formulação e o tempo. As diferenças entre níveis de um mesmo fator foram consideradas

significativas quando o *P-value* do teste *t* foi $< 0,05$, considerando um ajuste pela correção de Bonferroni. Todas estas análises foram realizadas com *SPSS statistics 17.0, 2008* ®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propriedades da suspensão de nanocápsulas

O valor de pH apresentado para a suspensão de nanocapsulas brancas foi de 6,19 e para a suspensão de nanocapsulas contendo capsaicinóides foi de 6,17. A quantidade de capsaicinóides presente foi de 0,31 mg/g de capsaicina e 0,18 mg/g de dihidrocapsaicina, equivalendo a 107% e 106% dos valores teóricos, respectivamente. Através da análise do diâmetro de partícula por volume da nanocapsula branca obtiveram-se valores de D[4,3] de 139nm e SPAN de 0,942. Para a amostra de nanocapsula contendo fármaco, obtiveram-se valores de D [4,3] de 137 nm e SPAN de 1,032. Na análise por número de partículas, os valores de D[4,3] foram de 138nm (SPAN = 0,971) para a suspensão de nanocápsulas brancas e D [4,3] de 137 nm (SPAN = 1,093) para a suspensão de nanocápsulas com capsaicinóides. A determinação da distribuição de diâmetro de partícula mostrou que ambas as formulações apresentaram um único pico nanométrico com boa homogeneidade entre partículas.

4.2. Propriedades das formulações semi-sólidas

Todas as formulações a base de quitosana desenvolvidas (A, B, D e E) apresentaram uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento caracterizando fluidos não-newtonianos (Figuras 1 e 2), como já previamente descrito (CONTRI et al., 2010). As formulações contendo nanocapsulas (Figura 1) e formulações preparadas a partir da solução hidroalcoólica (Figura 2) não foram avaliadas pelo mesmo método, visto que apresentavam viscosidades bastante diferentes e o torque necessário para análise deve estar entre 10 e 100. A grande diferença nas viscosidades observada ao se comparar as formulações com nanocápsulas e as formulações com soluções hidroalcoólicas pode ser devido a algum tipo de reação das cadeias de quitosana à presença do etanol. Além disso, observa-se que a

presença de fármaco, para os dois tipos distintos de gel de quitosana, não alterou a viscosidade das formulações.

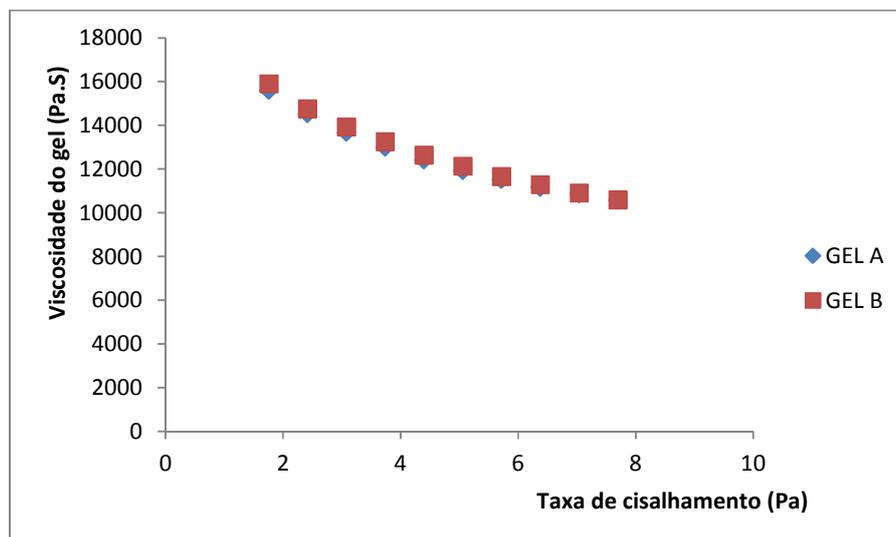


Figura 1 Viscosidade dos géis contendo nanocápsulas

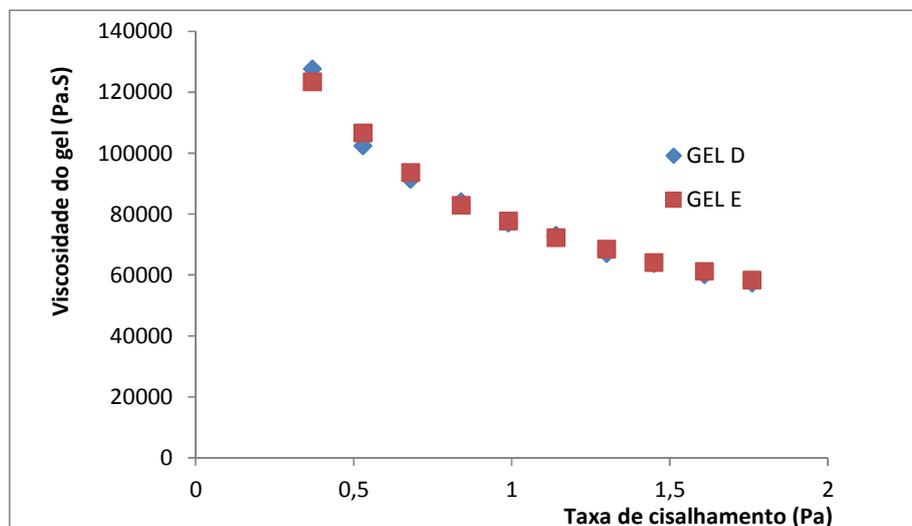


Figura 2 Viscosidade dos géis com solução hidroalcolica

As formulações apresentaram pH levemente ácido, devido a presença do ácido láctico, necessário para solubilização da quitosana e formação de gel, com valores considerados adequados para a aplicação cutânea (Tabela 1). Para os teores totais de capsaicinóides nos hidrogéis de quitosana com nanocapsula (A) e com solução hidroalcolica (E) obtiveram-se

valores em torno de 0,45 mg/g gel, muito semelhantes ao comercial (C), este sendo um pré-requisito para iniciar o estudo de irritação cutânea (Tabela 1).

Tabela 1 Valores de pH e conteúdo de capsaicinóides para as formulações

Formulação	A	B	C	D	E
Conteúdo de capsaicinóides	0,47mg/g	--	0,44mg/g	--	0,45mg/g
pH	4,5	4,5	7	4,5	4,2

A análise do tamanho de partícula demonstrou, por volume e por número de partículas, que as formulações contendo nanocapsulas (A e B) apresentaram distribuição nanométrica muito similar a aqueles observados para as suspensões de nanocápsulas. Este resultado indica que não há perda da estrutura nanométrica das partículas após incorporação nos hidrogéis de quitosana. A formulação comercial, por outro lado, apresentou partículas de tamanho micrométrico, conforme se observa nas Figuras 3 e 4, provando que o fármaco não está nanoencapsulado nessa formulação.

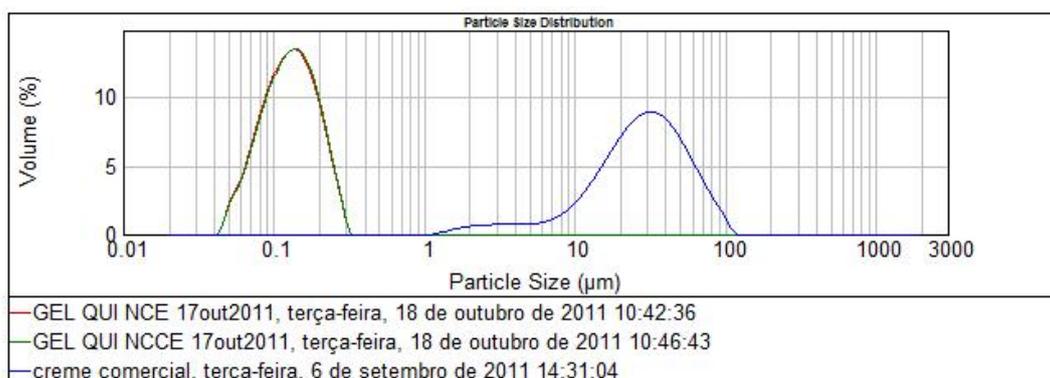


Figura 3 Distribuição de tamanho da partícula por volume

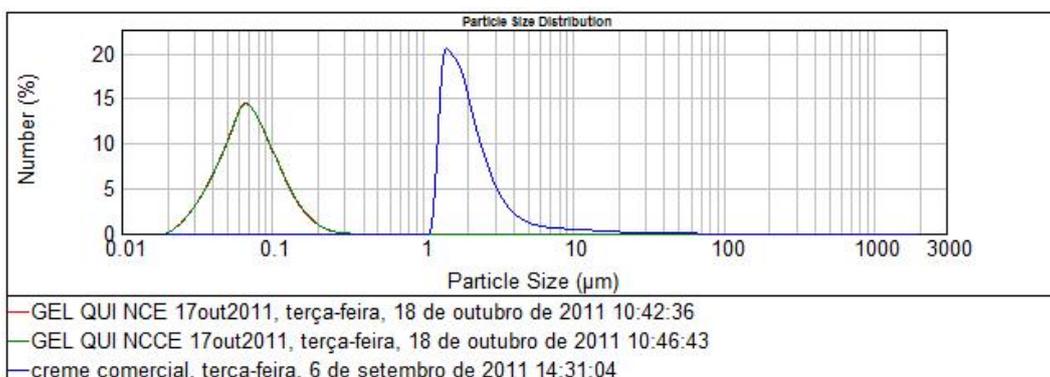


Figura 4 Distribuição de tamanho de partícula por número

4.3. Irritação Cutânea

Para validar a utilização da ANOVA de medidas repetidas na análise da irritação cutânea foi aplicado o teste de Mauchly, que indicou que a suposição de esfericidade foi comprovada para o fator tempo, $\chi^2(9)=11.88$, $p>0.05$. Por outro lado, quando considerada a formulação, o teste de Mauchly indicou que não foi possível assumir a suposição de esfericidade, $\chi^2(14)=41.46$, $p<0.05$, portanto, os graus de liberdade foram corrigidos utilizando a estimativa de esfericidade Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0.556$). Os resultados obtidos para as estimativas das médias do eritema (\pm erro padrão) para os efeitos principais de tempo e formulação e suas combinações são apresentados na continuação.

4.3.1. Efeito principal da formulação para o eritema observado

Considerando o efeito principal das formulações (A, B, C, D e E), sem considerar o tempo de análise do eritema, os resultados mostraram que existem diferenças significativas na variação do nível de eritema em função das diferentes formulações utilizadas ($F(5.00, 90.00)=30.41$, $p=0.000$). Isto significa que existem formulações específicas que se destacam das outras pela intensidade do eritema que estas produzem. Na Tabela 2 e Figura 5 observa-se que as formulações C (comercial) e E (formulação com capsaicinóides em solução hidroalcoólica) são as que apresentam maiores níveis de eritema produzido na pele dos voluntários. Estas duas formulações diferem-se significativamente das outras pelo nível de eritema produzido. Por outro lado, quando comparadas estas duas formulações, as mesmas não apresentaram diferenças significativas entre elas. O mesmo ocorre com as formulações A, B, D e F, as quais não apresentam diferenças significativas entre elas. Assim sendo, observaram-se dois grupos de formulações: aquelas que produzem níveis de eritema consideráveis (C e E) e aquelas que produzem níveis de eritema desprezíveis (A, B, D e F).

O eritema produzido pelas formulações C e E é provavelmente devido ao fato dos capsaicinóides estarem na forma livre e totalmente disponíveis para permeação. Já as formulações brancas (sem capsaicinóides) se assemelharam no efeito eritema à formulação com capsaicinóides nanoencapsulados, todas não diferindo significativamente da área da pele onde não houve aplicação de formulação, mostrando que a nanoencapsulação é capaz

de impedir qualquer formação de eritema capaz de ser medido pela sonda, provavelmente por retardar a permeação dos ativos devido ao controle de liberação (CONTRI et al., 2011). Analisando-se as formulações (B e D) objetivou-se também verificar se o veículo proposto não era capaz de produzir eritema. Verificou-se que a formulação B e a formulação D não apresentaram valores significativos de eritema sendo consideradas promissoras para veiculação de ativos dermatológicos e cosméticos.

Tabela 2 Estimativas das médias para o efeito principal da formulação (N=19)

Formulação	Eritema +/- erro padrão
A	166,312 ±8,40
B	164,965 ±10,33
C	235,491 ±10,42
D	161,200 ±8,33
E	215,607 ±12,88
F	173,284 ±6,95

Os dados ressaltados são os que apresentam diferenças significativas (<0.05).

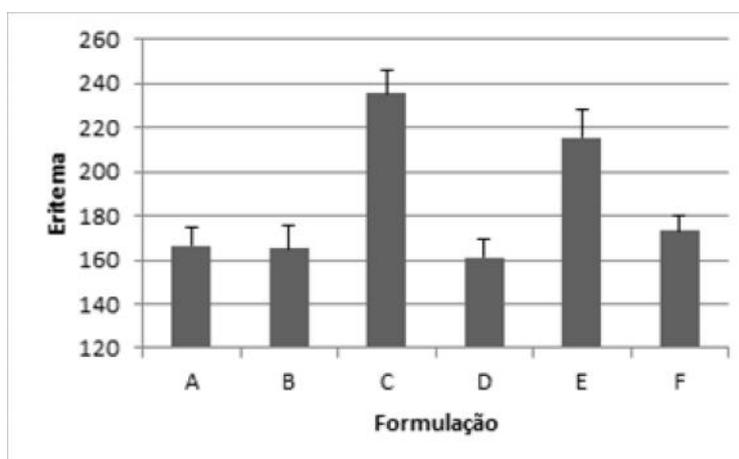


Figura 5 Medida de eritema para o efeito principal 'formulação'

4.3.2. Efeito combinado entre tempo e formulação para o eritema observado

Os tempos nos quais foram realizadas medidas de intensidade do eritema na pele dos voluntários foram: 0 min. (que representa o basal antes da primeira aplicação), 30min., 60min., 90min., e 120min. (após a aplicação). Considerando a interação dos fatores tempo e formulação, os resultados mostraram que existem efeitos significativos na variação do nível de eritema em função das diferentes formulações utilizadas ($F(5.00, 90.00)=30.41$, $p=0.000$). As diferenças significativas acontecem no período de 60 a 120 minutos. Na Tabela 3 e Figura 6 observa-se que, quando considerados ambos os fatores simultaneamente, as maiores intensidades de eritema acontecem no intervalo de 60 a 90 minutos para as formulações C (comercial) e E (formulação com capsaicinóides em solução hidroalcoólica), enquanto as outras formulações apresentaram valores praticamente constantes de eritema ao longo do tempo. Observaram-se diferenças significativas para estes tempos em relação as formulações C e E. Observa-se que, enquanto a formulação C atinge o eritema máximo em 60min (diferenciando-se significativamente de todas as demais formulações, inclusive da formulação E), a formulação E o faz 90min, embora este último não alcance valores tão altos quanto o primeiro nem se diferencie significativamente da formulação C. Este fato pode ter acontecido porque a formulação comercial (C) apresenta promotores de permeação cutânea na sua formulação, o que leva a mais rápida penetração cutânea dos ativos. Por outro lado, observou-se que a formulação com capsaicinóides em solução hidroalcoólica (E), apesar de também possuir um promotor de permeação (etanol), apresentava um retardo para gerar o eritema, porém quando esse atingia o valor máximo de eritema (90 minutos) a sensação de irritação nos voluntários demorou mais tempo para passar, e após 120 minutos de análise os voluntários ainda relatavam ardência ou queimação para essa formulação.

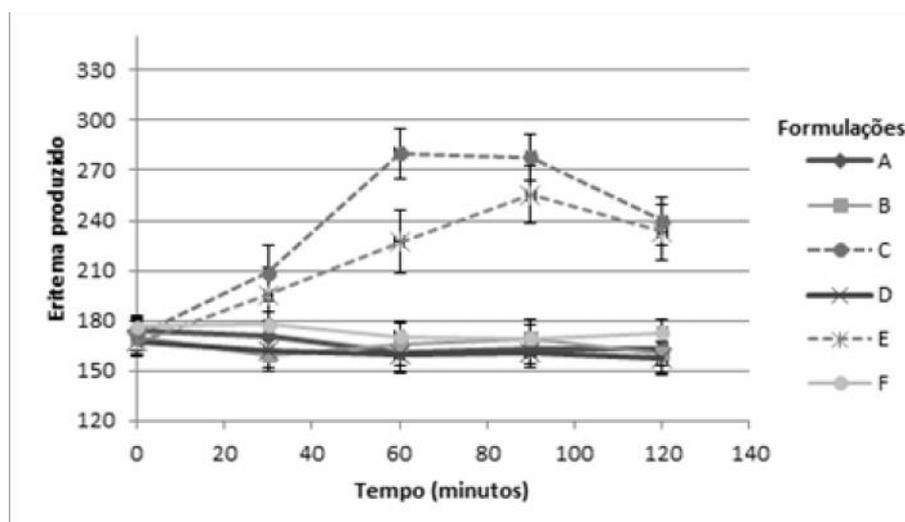


Figura 6 Análise de eritema para a interação do efeito ‘formulação’ e ‘tempo’

Tabela 3 Estimativas das médias de eritema produzido para a interação dos fatores (N=19)

	Médias +/- erro padrão					
	A	B	C	D	E	F
0min	173,86 ±7,91	169,77 ±9,78	171,25 ±8,95	167,23 ±8,61	166,97 ±7,74	176,54 ±6,49
30min	170,65 ±9,49	159,30 ±9,75	208,68 ±16,6	161,39 ±9,06	195,63 ±16,03	177,40 ±7,75
60min	160,68 ±11,2	165,81 ±12,7	280,16 ±14,9	159,37 ±11,2	226,89 ±18,9	170,21 ±9,13
90min	163,40 ±8,85	169,49 ±10,9	277,89 ±13,7	160,86 ±8,8	255,53 ±17,2	169,49 ±8,21
120min	162,96 ±9,72	160,46 ±11,9	239,47 ±14,7	157,16 ±9,71	233,02 ±16,6	172,77 ±8,15

Os dados ressaltados são os que apresentam diferenças significativas (<0.05).

A avaliação da formulação nanoencapsulada não apresentou níveis de eritema consideráveis com o passar do tempo do experimento. A nanocapsula está controlando a liberação dos fármacos a partir do gel (CONTRI et al., 2010) e provavelmente fazendo com que os mesmos sejam liberados lentamente sobre a pele, não deixando com que os capsaicinóides se acumulem na mesma evitando assim as características de irritação cutânea. Barceloux (2008) e Knotkava e colaboradores (2008) observaram que a produção de eritema gerado pela formulação leva os pacientes a abandonarem o tratamento, porém a formulação analisada nesse trabalho destaca-se da comercial por não produzir características de irritação nos voluntários o que poderá levar a uma melhor adesão ao tratamento dos mesmos. É importante ressaltar que o pouco tempo de contato de formulação com a pele (30 minutos) pode ter sido o responsável por não haver aumento leve de irritação ao longo do tempo.

Outra vantagem que a formulação contendo nanocapsulas pode apresentar é o menor número de aplicações ao longo do dia. Isso se deve pelo fato de a liberação da capsaicina esta sendo modulada pela nanocapsula levando a níveis de capsaicinóides ideais sobre a pele, níveis esses que não produzem eritema no paciente. Testes de permeação cutânea in vitro serão realizados para comprovar essas possíveis hipóteses.

4.3.3. Análise descritiva da irritação cutânea dos voluntários

Em relação à ficha que os voluntários preencheram observou-se que 93% deles sentiram sintomas de irritação de moderado a forte para a formulação C nos tempos 60 e 90 minutos, tempos nos quais se obtiveram os valores máximos de eritema para essa formulação quando medida com a sonda. Já para a formulação E, 67% dos voluntários responderam que sentiram sintomas de irritação também de moderado a forte, nos mesmos tempos. Para a formulação A, 33% dos voluntários escreveram sentir levemente sintoma de irritação no intervalo de tempo entre 30 e 60 minutos. Essa menor sensação se comparada com as formulações C e E (contendo os fármacos na forma livre) pode ser atribuída a presença da nanocapsula controlando a liberação dos fármacos, levando a baixa concentração de capsaicinóides disponíveis sobre a pele para iniciar o processo de irritação. Já para as formulações B (gel de quitosana contendo nanocápsula branca) e D (gel de quitosana contendo solução hidroalcoólica sem capsaicinóides) aproximadamente 13% e 20% dos voluntários, respectivamente responderam que sentiam levemente sintoma de irritação para esse mesmo intervalo de tempo. Estes resultados podem ser devido ao fato do gel de quitosana formar um filme sobre a pele o que pode ter gerado algum tipo de desconforto nos voluntários.

4.4. Análise do pH e hidratação cutânea

Durante o experimento foram realizadas medidas de pH da pele (Skin-pH-Meter, CKeletronic) no lugar onde foram aplicadas as formulações. Também foram realizadas medidas do grau de hidratação da pele (Tewameter TM30M, CKeletronic). Ambas as medidas foram realizadas no tempo 0 minutos (antes de ser aplicada a formulação) e no tempo 60 minutos (onde se observou maiores alterações na pele).

4.4.1. Controle do pH cutâneo

Para analisar os dados do pH estatisticamente, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas. Para validar a utilização desta técnica foi aplicado o teste de Mauchly, que indicou que não pode ser assumida a suposição de esfericidade para o fator ‘formulação’, $\chi^2(14)=25,53$, $p<0.05$, portanto, os graus de liberdade foram corrigidos utilizando a estimativa de esfericidade Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0.587$). Por outro lado, o fator principal ‘tempo’ assumiu uma esfericidade perfeita, uma vez que o mesmo foi considerado para apenas dois níveis do fator (tempo 0min e 60min). Quando considerada a interação do fator tempo com a formulação o teste de Mauchly, que indicou que não pode ser assumida a suposição de esfericidade, $\chi^2(14)=20.302$, $p<0.05$, portanto, os graus de liberdade foram corrigidos utilizando a estimativa de esfericidade Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0.678$).

Os resultados da ANOVA indicaram que não existem diferenças significativas para as medidas de pH quando considerado o fator ‘formulação’ ($F(2.94, 41.10)=30.41$, $p=0.230$). Por outro lado, para o efeito principal ‘tempo’, os resultados mostraram que existem diferenças significativas na variação do nível de pH entre o tempo de 0min e 60min $F(1.00, 14.00)=12.152$, $p=0.004$. O mesmo acontece com a interação de ambos os fatores, a qual indica que existem diferenças significativas no nível de pH para as diferentes formulações no intervalo de tempo considerado ($F(3.67, 58.69)=4.074$, $p=0.007$).

A partir desses resultados, na Figura 7 e na Tabela 4 observa-se que a média do pH para a formulação comercial permaneceu praticamente constante no intervalo de tempo considerado, não havendo diferença significativa. Para a formulação B e para a área onde não houve aplicação de formulação (F) também não se observaram significativas variações de pH cutâneo ao longo do tempo, apesar de se observar uma tendência. Para as demais formulações (A, D e E), todas compostas de hidrogéis de quitosana, observa-se uma queda significativa do pH de aproximadamente 5,20 para 4,70. Este fato poderia estar relacionado ao valor de pH dos géis de quitosana desenvolvidos se encontrarem numa faixa de pH levemente ácido, enquanto o comercial se encontrava na faixa de pH neutro.

Tabela 4 Estimativas das médias para o efeito pH

Tempo (min)	Formulação	Média	Erro padrão (+/-)
0 min	A	5,083	0,11
	B	5,179	0,15
	C	5,158	0,12
	D	5,164	0,13
	E	5,144	0,14
	F	5,115	0,14
60 min	A	4,894	0,11
	B	4,688	0,11
	C	5,125	0,11
	D	4,649	0,11
	E	4,656	0,14
	F	4,912	0,13

Os dados ressaltados são os que apresentam diferenças significativas (<0.05).

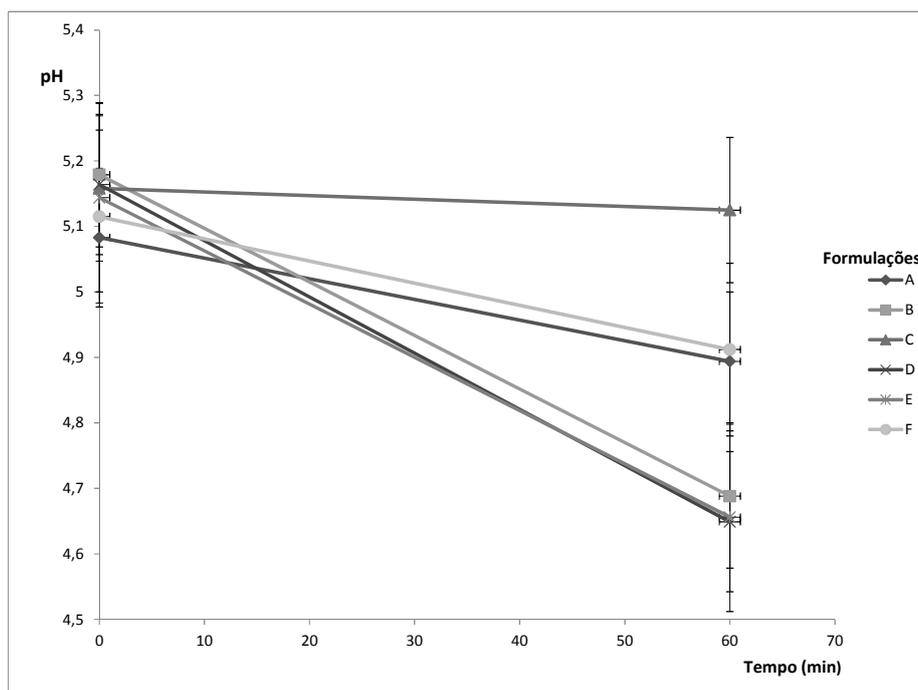


Figura 7 Análise do pH para a interação dos efeitos 'Tempo' e 'Formulação'

4.4.2. Controle da perda de água transepidérmica

Para analisar os dados da perda de água estatisticamente, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas. Para validar a utilização desta técnica foi aplicado o teste de Mauchly, que indicou que não pode ser assumida a suposição de esfericidade para o fator 'formulação', $\chi^2(14)=61.95$, $p<0.05$, portanto, os graus de liberdade foram corrigidos utilizando a estimativa de esfericidade Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0.445$). Por outro lado, o fator principal 'tempo' assumiu uma esfericidade perfeita, uma vez que o mesmo foi considerado para apenas dois níveis do fator (tempo 0min e 60min). Quando considerada a interação do fator tempo com a formulação o teste de Mauchly, que indicou que não pode ser assumida a suposição de esfericidade, $\chi^2(14)=46.90$, $p<0.05$, portanto, os graus de liberdade foram corrigidos utilizando a estimativa de esfericidade Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0.406$).

Os resultados da ANOVA (Tabela 5 e Figura 8) indicaram que não foram identificadas diferenças significativas para nenhum dos fatores principais, nem para a interação entre ambos os fatores: fator 'tempo' ($F(1, 16)=0.82$, $p=0.779$); fator 'formulação' ($F(2.23, 35.61)=1.58$, $p=0.219$); interação dos fatores ($F(2.03, 32.49)=0.587$, $p=0.71$). Portanto considera-se que não há influência das formulações na perda de água transepidermal. A partir dos dados descritivos individuais dos voluntários, foi possível observar que a variabilidade entre eles é alta e, além disso, observaram-se diferentes padrões de variação da hidratação para cada um deles. Isto significa que, enquanto para alguns voluntários o nível de hidratação foi decrescente ao longo do tempo, para outros o nível manteve-se constante ou foi crescente. Estas diferenças observadas entre voluntários dificultaram a observação de efeitos significativos para o conjunto. Da mesma forma que para o pH cutâneo, análises posteriores poderiam ser realizadas para considerar os indivíduos discriminadamente.

Tabela 5 Estimativas das médias para o efeito perda de água transepidermica

Tempo (min)	Formulação	Média	Erro padrão (+/-)
0 min	A	7,406	1,756
	B	6,253	0,603
	C	7,453	1,621
	D	6,912	1,073
	E	7,164	1,319
	F	6,971	0,948
60 min	A	7,288	0,499
	B	6,647	0,450
	C	8,571	1,004
	D	7,441	0,456
	E	6,771	0,400
	F	7,335	0,589

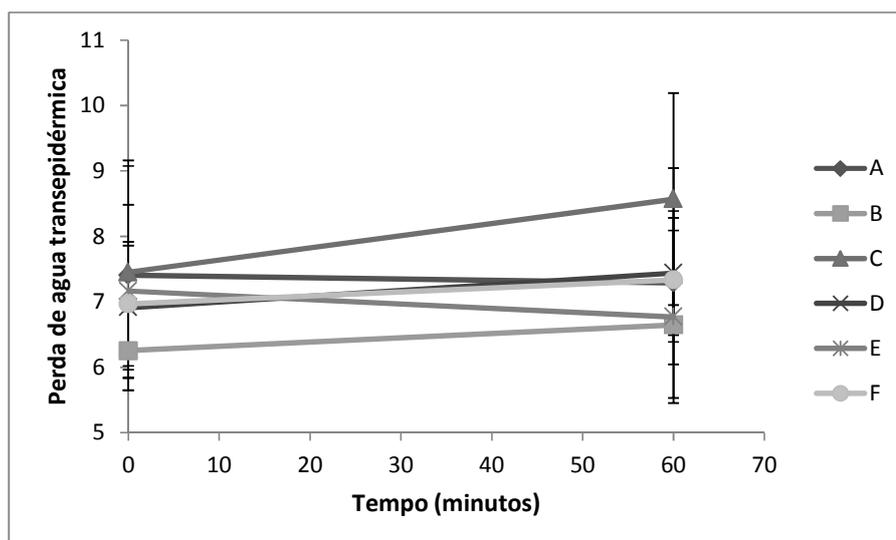


Figura 8 Análise da perda de água transepidermica para a interação dos efeitos 'Tempo' e 'Formulação'

5. CONCLUSÕES

O hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanocapsulados proposto nesse trabalho se destacou da formulação comercial e do hidrogel contendo ativos na forma livre por não apresentar efeitos característicos de irritação nos voluntários, sendo uma alternativa promissora para a diminuição do efeito indesejável sentido por parte dos pacientes, que geralmente contribui para o abandono do tratamento. As formulações não levaram a mudanças significativas de perda de água transepidérmicas quando aplicadas. Por outro lado a medida de pH dos voluntários apresentou variações significativas com o passar do tempo para 3 formulações de gel de quitosana, das 4 aplicadas. Análise dos indivíduos discriminadamente ou uma amostra maior de voluntários pode ser necessário para determinar o que de fato esta ocorrendo a nível de pH da pele. Conclui-se também que o veículo inovador proposto composto de quitosana e nanocápsulas poliméricas não apresentou efeito significativo de irritação nos voluntários, apresentando-se como alternativa promissora para aplicação de capsaicinóides ou outros ativos na pele.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.;GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **Int. J. Pharm.**v.341, p.215-220, 2007.
- AMORIM, C.M.; COUTO, A.G.; NETZ, A.J.; FREITAS, R.A.; BRESOLIM, M.B. Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and N-carboxymethylchitosan. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.** v.6, p.745-752, 2010.
- BARCELOUX D. G. **Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals.** Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 1157p.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**v57, p.19-34,2004.
- CONTRI, R.V.; KATZER, T.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery. **Soft Mat.**V.8, p.370-385, 2010.
- CONTRI R.V.; KAISER M., POLETTO F.S., POHLMANN A.R., GUTERRES,S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules, **J. Nanosci. Nanotechnol.**V.11, p.2398-2406, 2011.
- ERIN, N.; ZIK, B.; SARIGÜL, M.; TÛTÛNCÛ. S. The effects of chronic low-dose capsaicin treatment on substance P levels. **Regulatory Peptides.**v.153, p.83-87, 2008.
- FLUHR, J.W.; KUSS, O.; DIEPGEN, T.; LAZZERINI, S.; PELOSI, A. GLOOR, M.; BERARDESCA, E. Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. **British Journal of Dermatology**, v.145, p.696-703, 2001.
- 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.
- HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v.19, p.338-343, 2008.
- KNOTKOVA, H.; PAPPAGALLO, M.; SZALLASI, A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief- Farewell or revival? **Clinical Journal of Pain.** v.24, p.142-154, 2008.
- LIU, X. F.; GUAN, Y.L.; YANG, D.Z.; LI, Z.; YAO, K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **J. Appl. Polym. Sci.** v79, p.1324-1335,2001.
- PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid formulation containing an nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, in vitro photostability and immuneresponse. **J. Biom. Nanotech.**v5, p.1-7, 2009.
- POPLE, P.V.; SINGH, K.K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. **International Journal of Pharmaceutics.** v.398, p.165-178, 2010. RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética.** São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- PUGLIESE, P.T. **Physiology of the skin.** Illinois: Allured Publishing, 1996.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Prog. Polym. Sci.** v.31, p.603-632, 2006.
- 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.1-12,2003.
- SHAH, K.A.; DATE, A.A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery, **International Journal of Pharmaceutics.** v.345, p.163-171, 2007.

- SIKAND, P.; SHIMADA, S.G; GREEN, B.G.; LAMOTE, R.H. Sensory responses to injection and punctate application of capsaicin and histamine to the skin. **Pain**, v.152, n.11, p. 2485-2494, 2011.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKANI, A R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Contr.Release** v.70, p.1-20, 2001.
- TEDESCO, A. C.; SIMONI, A. R.; PRIMO, F. L. Introdução à nanotecnologia. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas: células-tronco, terapia genética e nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007.
- TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. Development of Semi-Solid Cosmetic Formulations Containing Coenzyme Q10-Loaded Nanocapsules. **Lat. Am. J. Pharm.** v.28, p.819-826, 2009.
- UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.52, p.105-115, 2001.
- VALENTA, C.; AUNER, B. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.58, p.279-289, 2004.
- WELSS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRODERA, K.R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro**. v.18 p.231–243, 2004.
- ZI, P.; YANG, X.; KUANG H.; YANG, Y.; YU, L. Effect of HP- β -CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. **Int. J. Pharm.** v.358, p.151-158, 2008.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: ESTUDO DO POTENCIAL IRRITANTE DE
FORMULAÇÕES DERMATOLÓGICAS CONTENDO
CAPSAICINÓIDES

Objetivo: Analisar o potencial irritante de formulações destinadas ao uso tópico de capsaicinóides.

Quanto tempo que terei de ficar disponível e quantas sessões serão necessárias: As análises terão sessão de 3h aproximadas.

Detalhes sobre todos os procedimentos: Inicialmente as pesquisadoras do projeto irão abordá-lo apresentando o projeto e os objetivos. Se você aceitar participar da pesquisa, assinará este documento e em seguida participará da análise.

Equipamentos ou instrumentos que serão utilizados: Durante a realização da prática, serão utilizados como ferramenta um molde plástico para delimitar a área de aplicação dos produtos e sondas para medição de eritema, pH e hidratação cutânea, indolores. Análise visual por parte do avaliador também ocorrerá.

É preciso vestir alguma roupa ou sapato apropriado: Não há necessidade de vestimenta adequada, os braços devem estar à mostra no momento do teste e serem lavados antes do teste com um sabonete neutro que será fornecido.

Quais as medidas a serem obtidas? Análise de eritema na pele, bem como pH e hidratação cutânea. Além disso, os voluntários serão questionados quanto a suas sensações após a aplicação dos produtos.

Quais os riscos e desconfortos que podem ocorrer? Provavelmente haverá formação de prurido e irritação com efeito passageiro. Gestante e pessoas com alergia a crustáceos e pimenta não devem realizar o teste, bem como pessoas com tipo de pele IV (Pele morena clara, raramente queima, sempre bronzeia), V (Pele morena escura, nunca queima, sempre bronzeia) e VI (Pele negra, nunca queima, sempre bronzeia), segundo a classificação de Fitzpatrick.

Quais os meus benefícios e vantagens em fazer parte deste estudo? Além de ajudar neste trabalho de pesquisa, você estará contribuindo para avaliação das vantagens de novas formulações para uso tópico. A participação é voluntária, não havendo custos para o participante, nem pagamento pela sua participação.

Quais as pessoas que estarão me acompanhando durante os procedimentos práticos deste estudo? As pesquisadoras envolvidas no projeto (MSc. Renata V. Contri e a aluna Luiza A. Frank).

Existe algum questionário que preciso preencher? Sou obrigado a responder a todas as perguntas? Durante o andamento da prática, haverá um questionário que os participantes deverão responder. Não há obrigatoriedade de resposta. Você pode se retirar da pesquisa sem dar nenhuma explicação.

CONTATOS: **Silvia S. Guterres** (51)33085500 silvia.guterres@ufrgs.br – Pesquisadora responsável pelo projeto, **Renata V. Contri** (51)92343604 renatacontri@gmail.com - Doutoranda do PPGCF UFRGS, **Luiza A. Frank** (51)94137830 farmluiza.abrahamo@gmail.com – Aluna da Faculdade de Farmácia UFRGS. **CEPE UFRGS:** (51)3308-3052.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa intitulada ESTUDO DO POTENCIAL IRRITANTE DE FORMULAÇÕES DERMATOLÓGICAS CONTENDO CAPSAICINÓIDES e que recebi, de forma clara e objetiva, todas as explicações pertinentes ao projeto e que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim.

Declaro que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso : _____

RG : _____

Local e Data: _____

Assinatura: _____

Adaptado de: (1) South Sheffield Ethics Committee, Sheffield Health Authority, UK; (2) Comitê de Ética em Pesquisa - CEFID - Udesc, Florianópolis, BR.

Planilha de coleta de dados (sondas)

Voluntário

:

Data:

Hora da aplicação:

Tempo (min)	Posição de aplicação da amostra	Eritema			pH		Hidratação
		Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3	Obs. 1	Obs. 2	
0	A						
0	B						
0	C						
0	D						
0	E						
0	F						
30	A				--	--	--
30	B				--	--	--
30	C				--	--	--
30	D				--	--	--
30	E				--	--	--
30	F				--	--	--
60	A						
60	B						
60	C						
60	D						
60	E						
60	F						
90	A				--	--	--
90	B				--	--	--
90	C				--	--	--
90	D				--	--	--
90	E				--	--	--
90	F				--	--	--
120	A				--	--	--
120	B				--	--	--
120	C				--	--	--
120	D				--	--	--
120	E				--	--	--
120	F				--	--	--

Ficha de Voluntários - Teste de Irritação cutânea

Voluntário:

Data:

Horada aplicação:

Atribua valores para sensações características de irritação (ardência, coceira, queimação) que você está sentindo.

Utilize a seguinte escala:

0-não sinto / 1- sinto levemente / 2- sinto consideravelmente

/ 3- sinto fortemente

Posição de aplicação da amostra	Tempo (min)	Atribuição para irritação
A	30	
	60	
	90	
	120	
B	30	
	60	
	90	
	120	
C	30	
	60	
	90	
	120	
D	30	
	60	
	90	
	120	
E	30	
	60	
	90	
	120	
F	30	
	60	
	90	
	120	