

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NANOCÁPSULAS DE
CETOPROFENO EM UM MODELO DE EDEMA DE ORELHA**

Priscila Treptow Ramos

Pelotas, 2017

Priscila Treptow Ramos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NANOCÁPSULAS DE
CETOPROFENO EM UM MODELO DE EDEMA DE ORELHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Elizandra Braganhol, Dra.

Co-orientadora: Profa. Roselia Maria Spanevello, Dra.

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R175a Ramos, Priscila Treptow

Avaliação da atividade anti-inflamatória de nanocápsulas de cetoprofeno em um modelo de edema de orelha, 2017 / Priscila Treptow Ramos ; Elizandra Braganhol, orientadora ; Roselia Maria Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2017.

79 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Edema. 2. Óleo de cróton. 3. Nanocápsulas. 4. Cetoprofeno. I. Braganhol, Elizandra, orient. II. Spanevello, Roselia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

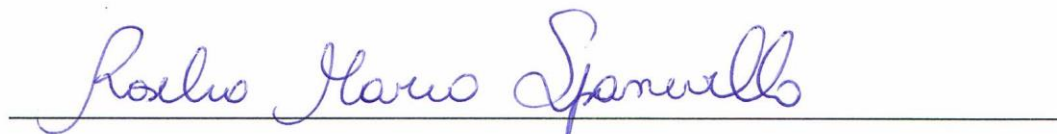
Priscila Treptow Ramos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NANOCÁPSULAS DE
CETOPROFENO EM UM MODELO DE EDEMA DE ORELHA**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

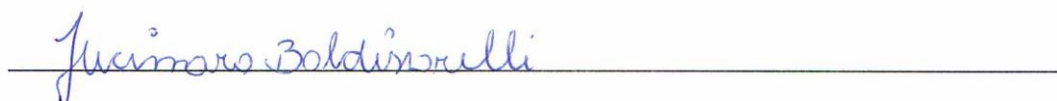
Data da Defesa: 11 de setembro de 2017

Banca examinadora:



Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello (Co-orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof^a. Dr^a. Jucimara Baldissarelli

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.



Prof. Dr. César Augusto Brüning

Doutor em Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

Dedico este trabalho aos meus pais, meus avós,
meu namorado e minha irmã pelo apoio e amor
incondicional.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido a vida, força para superar as dificuldades, por permitir que tudo isso acontecesse, não somente nestes anos de estudo, mas em todos os momentos.

Ao meu namorado Luís Fernando, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiou nos momentos de dificuldades e sempre está em todas as horas comigo. Você foi à pessoa que compartilhou comigo os momentos de tristezas e alegrias. Além deste trabalho, dedico todo meu amor a você.

Aos meus avós, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço a minha mãe, que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço.

Ao meu pai que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e me concedeu todo apoio e carinho.

À toda minha família por estar ao meu lado e torcendo em mais uma etapa da minha vida.

Agradeço toda ajuda dos funcionários do biotério central, de forma especial a Anelise, que me ensinou a lidar com os camundongos e ajudou-me nos experimentos no biotério.

A minha orientadora Elizandra, agradeço pelo empenho e oportunidade na elaboração deste trabalho. Agradeço muito, pelo suporte e incentivo, pois sempre apostou na minha dedicação.

A querida Prof^a Roselia que me co-orientou com muito carinho, agradeço muito pelo aprendizado que me concedeu, também pelo apoio, suporte, incentivo e por estar sempre disposta a ajudar, escutar e conversar.

A minha colega de laboratório e amiga Nathalia, que muitas vezes compartilhei momentos de tristezas, alegrias, angústias e ansiedade, mas que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando até o fim.

A todos os amigos e colegas do NEUROCAN, em especial a Mayara e a Pathise que me ajudaram na realização deste trabalho, obrigada por todo apoio, ajuda, disposição e carinho de vocês.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Maria, em especial a Professora Dra. Letícia Cruz e a Doutoranda Luana pelas colaborações na realização dos experimentos com as nanocápsulas.

A Prof^a e patologista Fabiane Grecco e a aluna Luísa Mariano que aceitaram e me receberam com muito carinho para analisar as lâminas histológicas do meu experimento, obrigada pela dedicação e apoio de vocês.

Agradeço ao PPGBBio pela oportunidade e a todos professores por todo aprendizado.

Aos professores da banca por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas pela formação acadêmica.

À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Resumo

RAMOS, Priscila Treptow. Avaliação da atividade anti-inflamatória de nanocápsulas de cetoprofeno em um modelo de edema de orelha, 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As nanopartículas poliméricas estão relacionadas principalmente por suas propriedades de controle da liberação e transporte de fármacos para sítios específicos, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos adversos. O cetoprofeno é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) que inibe a atividade das enzimas ciclo-oxigenase e lipoxigenase. No entanto, a utilização deste fármaco pode resultar em efeitos adversos importantes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar sistemas de base nanotecnológica preparados a partir do cetoprofeno em um modelo experimental de inflamação aguda e crônica. Foram utilizados camundongos machos C57/BL-6 que foram divididos em seis grupos: I- acetona, II- óleo de cróton (0,1 mg/ μ L), III- óleo de canola, IV- nanocápsula branca, V- cetoprofeno livre (10 mg/kg) e VI cetoprofeno em nanocápsulas (10 mg/kg). O processo inflamatório agudo foi realizado a partir da aplicação única de óleo de cróton na face interna das orelhas dos camundongos. Após três horas desta aplicação, os animais foram tratados com cetoprofeno livre ou nanoencapsulado (10 mg/kg). Após seis horas da indução do edema os animais foram eutanasiados. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton nas orelhas de camundongos em dias alternados, a partir do 1º ao 9º dia de tratamento terapêutico e do 4º ao 11º dia para um tratamento profilático. Os animais foram tratados por via oral com cetoprofeno livre ou nanoencapsulado durante cinco dias no protocolo terapêutico e 11 dias no protocolo profilático. No protocolo crônico terapêutico foram analisados parâmetros histológicos (edema, hiperplasia da epiderme e infiltrado inflamatório) e de estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX e GR) e conteúdo tiólico total (SH). Para realização da curva de dose resposta, foi realizado o mesmo protocolo crônico terapêutico, aos quais foram testadas diferentes doses de cetoprofeno em nanocápsulas (2,5; 5 e 10 mg/kg). O óleo de cróton induziu edema nas orelhas dos animais em todos os protocolos, no entanto

após o tratamento com o anti-inflamatório cetoprofeno na forma livre e nanoencapsulado no tratamento agudo verificou-se que ambos foram capazes de reduzir o edema de orelha demonstrado pela redução de aproximadamente 24% do peso das orelhas. Além disso, no protocolo terapêutico o cetoprofeno nanoencapsulado apresentou uma resposta mais efetiva quando comparado ao fármaco na forma livre, reduzindo em 60%, 65% e 71% a espessura das orelhas nos dias 7, 8 e 9 respectivamente, quando comparado ao grupo óleo de cróton. Este resultado foi confirmado na análise histológica, onde pode-se observar uma redução da epiderme, edema e infiltrado inflamatório. O óleo de cróton alterou os parâmetros de estresse oxidativo no plasma e eritrócitos de camundongos. Entretanto, os tratamentos não causaram mudanças na produção de ROS e no índice total do sulfidrilas, mas aumentaram os parâmetros enzimáticos (SOD, CAT e GPx). Pode-se observar ainda uma melhor dose resposta na concentração de 5 mg/kg do cetoprofeno nanoencapsulado, reduzindo o edema em uma dose 50% inferior a considerada terapêutica para camundongos, o que comprova o seu efeito. Os resultados mostraram que o cetoprofeno nanoencapsulado foi mais eficiente do que na forma livre em reduzir as alterações induzidas por um modelo de inflamação. Estes dados podem ser importantes na busca de medicamentos com menores efeitos adversos para pacientes com doenças inflamatórias crônicas.

Palavras-chave: edema; óleo de cróton; nanocápsulas; cetoprofeno.

Abstract

RAMOS, Priscila Treptow. Evaluation of anti-inflammatory activity of ketoprofen nanocapsules in a model of ear edema, 2017. Dissertation (MSc.) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Polymeric nanoparticles are mainly related to their properties of controlling the release and transport of drugs to specific sites, increasing therapeutic efficacy and reducing adverse effects. Ketoprofen is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that inhibits the activity of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes. However, the use of this drug may result in significant adverse effects. Thus, the objective of this study was to evaluate nanotechnological based systems prepared from ketoprofen in an experimental model of acute and chronic inflammation. Male C57/BL-6 mice were divided into six groups: I-acetone, II-chroton oil (0.1 mg/ μ L), III-canola oil, IV-white nanocapsule, free V-ketoprofen 10 mg/kg) and VI ketoprofen in nanocapsules (10 mg/kg). The acute inflammatory process was performed from the single application of chroton oil on the inside of the ears of the mice. After three hours of this application, the animals were treated with either free or nanoencapsulated ketoprofen (10 mg/kg). After six hours of edema induction the animals were euthanized. The chronic inflammatory process was induced by the application of chroton oil to the ears of mice on alternate days, from the 1st to the 9th day of therapeutic treatment and from the 4th to the 11th day for a prophylactic treatment. After six hours of edema induction the animals were euthanized. The chronic inflammatory process was induced by the application of chroton oil to the ears of mice on alternate days, from the 1st to the 9th day of therapeutic treatment and from the 4th to the 11th day for a prophylactic treatment. The animals were orally treated with either ketoprofen free or nanoencapsulated for five days in the therapeutic protocol and 11 days in the prophylactic protocol. In the chronic therapeutic protocol, histological parameters (edema, epidermal hyperplasia and inflammatory infiltrate) and oxidative stress (reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX and GR) and total thiol content (SH) were analyzed. To perform the dose response curve, the same chronic therapeutic protocol was performed, with different doses of ketoprofen being tested in

nanocapsules (2.5, 5 and 10 mg / kg). Croton oil induced edema in the ears of animals in all protocols, however, after treatment with free and nanoencapsulated anti-inflammatory ketoprofen in the acute treatment, it was found that both were able to reduce the ear edema demonstrated by the reduction of about 24% of the weight of the ears. Furthermore, in the therapeutic protocol, the nanoencapsulated ketoprofen had a more effective response when compared to the drug in the free form, reducing the thickness of the ears on days 7, 8 and 9 by 60%, and 71%, respectively, when compared to the oil group of croton. This result was confirmed in the histological analysis, where a reduction of the epidermis, edema and inflammatory infiltrate can be observed. Croton oil altered the parameters of oxidative stress in the plasma and erythrocytes of mice. However, the treatments did not cause changes in ROS production and total sulfhydryl content, but increased the enzymatic parameters (SOD, CAT and GPx). A better dose response at the 5 mg / kg concentration of nanoencapsulated ketoprofen can be observed, reducing edema at a dose 50% lower than that considered for mice, which proves its effect. The results showed that the nanoencapsulated ketoprofen was more efficient than in the free form in reducing the changes induced by a model of inflammation. These data may be important in the search for drugs with lower adverse effects for patients with chronic inflammatory diseases.

Keywords: edema; croton oil; nanocapsules; ketoprofen.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas.

Figura 2. Estrutura do Cetoprofeno.

Lista de Abreviaturas

AC - Acetona

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CA - Óleo de canola

CAT - Catalase

CFA - Adjuvante completo de Freund

CO - Óleo de cróton

COX 1 - Ciclo-oxigenase 1

COX 2 - Ciclo-oxigenase 2

DMSO - Dimetilsulfóxido

ERs - Espécies reativas

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

FBS - Soro fetal bovino

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

Keto-free - Cetoprofeno em solução

Keto-NC - Cetoprofeno nanoencapsulado

MCT - Triglicerídeos de cadeia média

NaCl - Cloreto de sódio

NC - Nanocápsula sem o fármaco

NSAIDs - Anti-inflamatórios não esteroidais

PGE2 - Prostaglandina E2

PGD2 - Prostaglandina D2

PGF2 α - Prostaglandina F2 alfa

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SH - Conteúdo tiólico total

SOD - Superóxido dismutase

TAC - Tacrolimus

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1.	Resumo	07
2.	Introdução	15
3.	Objetivos	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivos específicos	18
4.	Revisão da literatura	20
4.1	Processo inflamatório	20
4.2	Processo inflamatório e estresse oxidativo	22
4.3	Anti-inflamatórios não esteroidais	23
4.4	Nanopartículas poliméricas	24
4.5	Cetoprofeno	28
4.6	Modelo de edema de orelha	30
5.	Manuscrito	32
6.	Conclusões	70
	Referências	73
	Anexos	80

1. Introdução

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa do organismo que ocorre em resposta a uma lesão tecidual, cujo principal objetivo é eliminar o estímulo nocivo e promover a regeneração dos tecidos (KUMAR, COLLINS, 2000; KUMMER, 2002). No entanto, se esse processo persistir, podem ocorrer danos celulares e teciduais e desencadear doenças crônicas graves, como doenças neurodegenerativas, enfisema, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e câncer (PISOSCHI e POP, 2015).

Além disso, dados da literatura tem relatado a associação do processo inflamatório com a formação de espécies reativas (ERs) tais como radical superóxido - $O_2 \cdot^-$, ácido hipocloroso - HClO, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dentre outros, as quais podem ser produzidas por células inflamatórias, principalmente neutrófilos, monócitos e linfócitos como mecanismo de defesa contra agentes agressivos. No entanto, quando existe uma produção exacerbada destas ERs, estas podem causar danos aos tecidos e estresse oxidativo (BISWAS, 2016). Para controlar estes danos e a formação de ERs, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante que proporciona maior proteção contra o estresse oxidativo e neutraliza essas ERs. Este sistema inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas C e E, glutathione (forma reduzida, GSH) e beta caroteno (PISOSCHI e POP, 2015).

Dessa forma, o uso de substâncias químicas para atenuar processos inflamatórios e relacionados à dor é uma das necessidades mais antigas da humanidade. Diversas doenças inflamatórias requerem o uso de uma série de fármacos, tais como os glicocorticoides e os anti-inflamatórios não esteroidais, sendo este último um dos mais utilizados para controlar a dor e a inflamação (BATLOUNI, 2010; COSTA; BECK, 2011; LAEV; SALAKHUTDINOV, 2015). Os anti-inflamatórios não esteroidais constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas Agem por meio da inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2). Dentre os representantes

desta classe encontra-se o cetoprofeno, um fármaco capaz de inibir a COX 1 e 2 e a lipoxigenase (KHAYRULLINA et al., 2014). Apesar da eficácia, o cetoprofeno apresenta algumas limitações como meia-vida plasmática curta, exigindo várias administrações diárias e dosagem alta para alcançar uma eficácia terapêutica. Além disso, o uso prolongado desse fármaco geralmente está associado a sérios efeitos adversos, como ulceração gastroduodenal, hemorragia digestiva e perfuração intestinal (FIORUCCI; ANTONELLI; MORELLI, 2001; MEEK et al., 2010; AL-SAEED, 2011; PHAM, 2011; LAEV; SALAKHUTDINOV, 2015; SMOLEN; ALETAHA, 2015).

A fim de minimizar os efeitos adversos e melhorar a eficiência terapêutica, estudos de novas estratégias com potencial eficácia e segurança foram e continuam sendo bastante realizados. Dentre essas possíveis estratégias destacam-se o desenvolvimento da nanotecnologia com sistemas de liberação de fármacos, especialmente as nanopartículas poliméricas (BERNARDI et al., 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; FRODER et al., 2016; GENARI et al., 2016; ZHANG et al., 2016). As nanopartículas compreendem as nanocápsulas e as nanoesferas, esses sistemas apresentam dimensões situadas entre 100-500 nm e diferem entre si de acordo com a composição e estrutura (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; FRIEDRICH et al., 2016). As nanocápsulas constituem uma alternativa terapêutica interessante em relação às nanoesferas, pois além de proteger e aumentar a estabilidade dos fármacos possuem propriedades de liberação prolongada (SOPPIMATH et al., 2001; ENSIGN; CONE; HANES, 2012).

O interesse nas nanocápsulas está relacionado principalmente com as suas propriedades de controle na liberação e no transporte de fármacos para sítios de ação específicos, ou seja, permite a entrega de agentes terapêuticos, especificamente no sítio ativo da inflamação, aumentando desta forma a eficácia terapêutica, além de reduzir os efeitos adversos, bem como a dose administrada (PHAM, 2011). Dessa forma, o cetoprofeno torna-se um candidato promissor para a formulação de formas farmacêuticas de liberação controlada como as nanocápsulas, uma vez que existem poucos relatos na literatura sobre a associação do cetoprofeno a sistemas nanoencapsulados. Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar a atividade anti-inflamatória e caracterizar nanocápsulas de cetoprofeno através de um modelo de inflamação aguda e crônica utilizando modelo de edema de orelha em camundongos, buscando novas tecnologias em formulações farmacêuticas com o intuito de minimizar o curto tempo de meia-vida, a necessidade de várias

administrações diárias por via oral e a ocorrência de efeitos adversos gastrointestinais deste anti-inflamatório (KHERADMANDNIA; VASHEGHANI-FARAHANI; ATYABI, 2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar sistemas nanoencapsulados preparados a partir do cetoprofeno em um modelo experimental de inflamação aguda e crônica em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar nanocápsulas de cetoprofeno;
- Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas de cetoprofeno através de ensaio in vitro em linhagem de queratinócitos humano (HACAT);
- Analisar o potencial anti-inflamatório através de pesagem das orelhas de camundongos tratados com cetoprofeno nanoencapsulado comparando com o mesmo fármaco na forma livre, em modelo experimental de inflamação aguda;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório através de medição das orelhas de camundongos tratados com cetoprofeno nanoencapsulado comparando com o mesmo fármaco na forma livre em modelo experimental de inflamação crônica, utilizando um esquema de tratamento terapêutico;
- Analisar a ocorrência de danos gastrointestinais em diferentes locais do intestino (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos expostos ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;
- Avaliar por análise histológica parâmetros inflamatórios (edema, hiperplasia da epiderme e infiltrado inflamatório) em orelhas de camundongos expostos ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;
- Avaliar a toxicidade das nanocápsulas de cetoprofeno através de análise histológica de fígado e rim de camundongos expostos ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;

- Analisar as espécies reativas de oxigênio (ROS) em eritrócitos de camundongos exposto ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;
- Analisar o conteúdo tiólico total (SH) em plasma de camundongos expostos ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) em eritrócitos de camundongos expostos ao tratamento terapêutico crônico com cetoprofeno e cetoprofeno nanoencapsulado;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório através de medição das orelhas de camundongos tratados com cetoprofeno nanoencapsulado comparando com o mesmo fármaco na forma livre em modelo experimental de inflamação crônica, utilizando um esquema de tratamento profilático;
- Realizar uma curva de dose-resposta com o cetoprofeno nanoencapsulado em modelo experimental de inflamação crônica utilizando o esquema de tratamento terapêutico através de medição das orelhas de camundongos.

3. Revisão de Literatura

3.1 Processo inflamatório

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa do organismo diante de uma infecção ou de uma injúria tecidual, cujo principal objetivo é eliminar a lesão celular causada por patógenos ou por agentes físicos (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; KUMMER, 2002). De acordo com o tempo de duração, a inflamação pode ser aguda ou crônica (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). A inflamação aguda é essencial para proteger o organismo de patógenos invasores, caracteriza-se por curta duração, responsável por fazer reparação tecidual. No entanto, se o processo inflamatório persistir pode evoluir para inflamação crônica, com duração de semanas ou meses e resulta em danos nos tecidos e dor (MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2016).

A reação inflamatória consiste basicamente de dois mecanismos de defesa: uma resposta inata e uma resposta imune específica. Independente do tipo de agressão, a resposta inflamatória inicial consiste na resposta inata (inespecífica), que diante de uma lesão causa alterações no calibre vascular, com um aumento no fluxo sanguíneo (calor) e alterações na permeabilidade vascular, conduzindo ao extravasamento de líquidos orgânicos para o interstício, causando edema (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são provocados por mediadores como citocinas e leucotrienos. Os leucócitos circulantes, sob sinalização desses mediadores, migram para o local da lesão e fagocitam o agente agressor e degradam o tecido necrótico (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A resposta imune específica auxilia a resposta inata, no qual ocorre a produção de anticorpos específicos contra um determinado patógeno. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B e estes migram para a área inflamada através de uma interação com as moléculas de adesão e das células endoteliais (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual, resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características da área inflamada. Dentre os mediadores da inflamação estão os metabólitos do ácido araquidônico como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (RANG et al., 2007).

Através de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou através de outros mediadores, ocorre ativação dos fosfolipídeos das membranas celulares pela enzima fosfolipase A2, pelo qual libera o ácido araquidônico. Este ácido pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (KUMMER; COELHO, 2002; MIZUSHIMA, 2010).

A COX é uma enzima responsável pela síntese de prostaglandinas e pode existir em duas isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutiva e está presente em quase todos os tipos de células, com exceção das hemácias, é responsável pela formação de prostaglandinas, com diversas ações fisiológicas: constituição do trato gastrointestinal com produção de muco protetor com inibição da secreção ácida gástrica; agregação plaquetária, pois nas plaquetas, a COX-1 está associada com a síntese de tromboxano A2, um mediador que favorece a agregação e a adesão destas células (PIRES, 2009; MIZUSHIMA, 2010).

A COX-2 é indutiva, responsável pela formação de prostaglandinas durante o processo inflamatório. Esta enzima é expressa após estímulos inflamatórios mediados por citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais. As prostaglandinas PGE2, PGD2 e PGF2 α também são vasodilatadoras, além de exacerbarem o edema. Além disso, as prostaglandinas também estão envolvidas na patogenia da dor e da febre durante a inflamação (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2003).

As lipoxigenases estão presentes no citosol, são enzimas encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. Atuam sobre o ácido araquidônico, produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno A4. Este pode ser convertido em leucotrieno B4, produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos, um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e que causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos, linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GILMAN et al., 2006). Dessa forma, os metabólitos derivados do ácido araquidônico, representam componentes importantes da resposta imune inflamatória.

3.2 Processo inflamatório e estresse oxidativo

Durante o processo inflamatório, ocorre uma intensa infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, monócitos e linfócitos no local da lesão (BISWAS, 2016). Como mecanismo de defesa contra agentes agressores, estas células produzem uma grande quantidade de espécies reativas (ERs) e outros mediadores no local da inflamação (BARREIROS; DAVID e DAVID, 2006). Essas ERs em baixas quantidades participam de várias funções fisiológicas importantes no organismo como resposta celular a agentes infecciosos, sinalização celular, indução da resposta mitogênica, neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e regulam o sistema imune (GUERRERO e ACOSTA, 2016). No entanto, quando ocorre uma produção exacerbada das ERs, estas acabam induzindo ao estresse oxidativo e sérios danos aos tecidos como peroxidação dos lipídios de membrana, danos a proteínas, a enzimas, carboidratos e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (BISWAS, 2016).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de ERs e das defesas antioxidantes resultando no aumento exacerbado de ERs e diminuição das enzimas antioxidantes (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). As principais ERs estão divididas em espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Dentre as principais EROs estão os radicais: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}\bullet$); e os não radicais: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Já as ERNs incluem o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O estresse oxidativo tem sido relacionado com diversas patologias inflamatórias como doenças neurodegenerativas, enfisema, doenças cardiovasculares, inflamatórias e câncer (PISOSCHI e POP, 2015).

Para controlar os danos causados pelo excesso de ERs, o organismo precisa de um sistema de defesa antioxidante que consiste num conjunto de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que protegem as células contra os efeitos danosos das ERs (GODIG et al., 2014). Essa defesa antioxidante pode ser produzida pelo organismo ou absorvida da dieta. As defesas antioxidantes produzidos pelo organismo inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e antioxidantes não enzimáticos tais como

glutathiona (forma reduzida, GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e o ácido diidrolipóico (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Além disso, o organismo também utiliza a defesa antioxidante proveniente da alimentação que inclui o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos que proporcionam proteção contra o estresse oxidativo e neutralizam os ERs formadas pelo metabolismo celular ou por alguma disfunção patológica, como a inflamação (PISOSCHI e POP, 2015).

Dessa forma o uso de substâncias químicas para atenuar o processo doloroso e inflamatório com ação antioxidante para evitar danos às estruturas celulares através das ERs é uma das necessidades mais antigas da humanidade. Com isso torna-se interessante analisar a ação do cetoprofeno em nanocápsulas sobre parâmetros de estresse oxidativo em modelos experimentais de inflamação.

3.3 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais constituem uma classe de fármacos que atuam inibindo a COX e as lipoxigenases, impedindo a formação de mediadores do processo inflamatório, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, combatendo assim a inflamação, dor e a febre (RANG, 2007). Os fármacos dessa classe que se destacam são: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, cetoprofeno, diclofenaco e o piroxicam, todos inibidores não seletivos da COX (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Em geral, esses fármacos inibem de forma variável as isoformas COX-1 e COX-2. No entanto, os que inibem a COX-1 apresentam muitos efeitos adversos principalmente no trato gastrointestinal, podendo produzir ulcerações gástricas e duodenais, na função renal e na agregação plaquetária, tornando limitante o uso desses fármacos (AL-SAEED, 2011). Esses efeitos adversos se devem ao fato da COX-1 bloquear a biossíntese de prostaglandinas, principalmente PGE₂ que tem um forte efeito na citoproteção gástrica (MIZUSHIMA, 2010).

A maioria desses fármacos não inibe a atividade das lipoxigenases podendo resultar na formação de leucotrienos B₄ na mucosa gástrica, ocasionando quimiotaxia e adesão de leucócitos ao endotélio vascular (GILMAN et al., 2006) e também resultam na formação de leucotrienos C₄ e D₄ que atuam como vasoconstritores, aumentando o dano gástrico causado pelos anti-inflamatórios não

esteroidais e levando a continuidade do processo inflamatório por outros mecanismos (PIRES, 2009). Para evitar esses efeitos adversos gastrointestinais causados pelos inibidores da COX-1, foram desenvolvidos os inibidores seletivos para COX-2 (por exemplo, celecoxibe) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). No entanto, também tem sido relatado que estes causam sérios efeitos adversos, dentre os mais comuns são danos hepáticos, infecções e riscos cardiovasculares (MEEK et al., 2010; PHAM, 2011; PELLIGAND et al., 2014; LAEV E SALAKHUTDINOV, 2015, SMOLEN E ALETAHA, 2015). A fim de minimizar esses efeitos adversos, novas estratégias terapêuticas com maior eficácia e segurança foram e continuam bastante estudados envolvendo o desenvolvimento da nanotecnologia com sistemas de liberação de fármacos, especialmente as nanopartículas poliméricas (BERNARDI et al., 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; FRODER et al., 2016).

3.4 Nanopartículas poliméricas

Com o objetivo de melhorar o resultado da terapia farmacológica, vários pesquisadores têm buscado novos sistemas para o controle da liberação de substâncias em sítios de ação específicos (CORADINI et al., 2015; FRIEDRICH et al., 2016; FRODER et al., 2016). Nesse contexto, as nanopartículas poliméricas, como as nanocápsulas, apresentam esta característica com potenciais aplicações para a administração de moléculas terapêuticas (SOPPIMATH, 2001; SCHAFFAZICK, 2003).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos constituídos por polímeros biodegradáveis, que apresentam tamanho entre 100-500 nm (FRIEDRICH et al., 2016). As nanopartículas compreendem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si de acordo com a composição e estrutura (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Conforme ilustrado na figura 1, as nanocápsulas são sistemas que incorporam substâncias ativas, constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; SHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

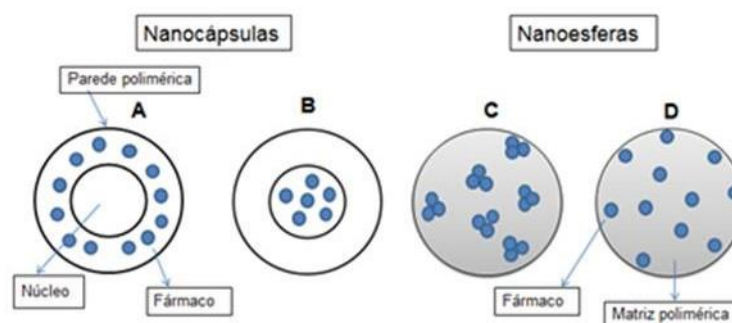


Figura 1. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas. A) Fármaco adsorvido na parede polimérica das nanocápsulas. B) Fármaco internalizado no núcleo oleoso das nanocápsulas. C) Fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas. D) Fármaco adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas (Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003, com modificações).

No entanto, as nanocápsulas constituem uma alternativa terapêutica muito interessante, pois protegem os fármacos ajudando a aumentar a estabilidade destes e possuem propriedades de liberação prolongada (SOPPIMATH et al., 2001; ENSIGN; CONE; HANES, 2012). As nanocápsulas são formadas por polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, geralmente naturais ou sintéticos (FARAJI; WIPF, 2009). A composição do polímero deve ser biocompatível com o fármaco e com a barreira da membrana da célula alvo, permitindo o aumento da solubilidade e capacidade de proteger as moléculas biologicamente ativas da degradação em meio fisiológico (GOLVEIA et al., 2015).

Além disso, as nanocápsulas despertaram um grande interesse, por apresentarem tamanho nanométrico, podem acumular-se seletivamente na região inflamada devido a maior permeabilidade microvascular nos locais inflamados (ULBRICH; LAMPRECHT, 2010; GOLVEIA et al., 2015). A principal vantagem das nanocápsulas em relação aos fármacos convencionais é a possibilidade de melhorar a liberação seletiva de medicamentos para o local de ação, independentemente da via de administração (GOLVEIA et al., 2015). A seletividade destas nanocápsulas no local da lesão pode ser alcançada através da modificação de superfície das nanopartículas com ligantes específicos, os quais se ligam em receptores expressos nas células-alvo, fazendo com que as nanocápsulas sejam internalizadas no espaço intracelular (FARAJI; WIPF, 2009). Dessa forma, possibilita diminuição da dose necessária, aumento da biodisponibilidade do fármaco no tecido inflamado e da

eficácia terapêutica evitando os graves efeitos adversos causados pelas medicações convencionais (GOLVEIA et al., 2015).

São sistemas que facilitam a passagem de fármacos pelas barreiras celulares, atuando como um depósito de fármaco dentro da célula, aumentando assim a liberação no sítio da lesão com consequente diminuição dos efeitos adversos, principalmente relacionados a uma menor lesão gastrointestinal (BERNARDI et al., 2009; ENSIGN; CONE; HANES, 2012, FRODER et al., 2016). As nanocápsulas também apresentam uma série de vantagens em relação às nanoesferas, tais como elevada eficiência de encapsulação do fármaco, devido a alta solubilidade do fármaco no núcleo, baixo conteúdo polimérico pelo qual protege os fármacos contra fatores de degradação, como pH, luz e reduz a irritação no tecido (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Como o fármaco está retido no núcleo das nanocápsulas, a liberação das substâncias ativas ocorre gradualmente, mantendo-se constante no organismo. Por essa razão, com o uso das nanocápsulas são evitadas possíveis irritações as quais ocorreriam se o fármaco estivesse livre para agir de uma única vez e com isso possibilita-se a administração de menores doses diárias (SHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005; FRANK et al., 2015).

Sendo assim, estudos de moléculas nanoencapsuladas com grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias têm sido avaliados em modelos animais de inflamação. Bernardi e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos de nanocápsulas com indometacina em modelos experimentais de inflamação em ratos, incluindo modelo de artrite, que consiste na injeção de adjuvante completo de Freund (CFA) na pata de ratos. Este agente é capaz de provocar um edema local relacionado com o tempo. Neste estudo foi possível observar que o tratamento com indometacina na forma livre e na forma nanoencapsulada foram capazes de diminuir esse edema, no entanto a forma nanoencapsulada da indometacina apresentou maior eficácia anti-inflamatória. Também foi realizada avaliação de lesão gastrointestinal, que se mostrou reduzida no grupo que recebeu tratamento com indometacina nanoencapsulada em comparação com o grupo que recebeu a indometacina livre. Este efeito protetor foi também atribuído pela redução dos níveis de TNF α e IL-6 (interleucina-6) e aumento de IL-10 (interleucina-10), mostrando assim que as nanocápsulas constituem uma

alternativa terapêutica segura para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (BERNARDI et al., 2009).

Além disso, Coradini e colaboradores (2015) investigaram o potencial de resveratrol e da curcumina na forma nanoencapsulada no tratamento da artrite induzida por CFA em ratos. Um amplo espectro de atividades biológicas tem sido atribuído a essas duas moléculas devido a suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quimioterapêuticas, mas ambas possuem algumas restrições, as mais comuns são baixa biodisponibilidade, instabilidade fotoquímica, eliminação sistêmica rápida, absorção tecidual inadequada e além dessas a curcumina apresenta degradação em pH fisiológico (BISHT et al., 2010). Neste sentido, os autores realizaram a associação de resveratrol e curcumina quer na sua forma livre e nanoencapsulados como uma estratégia para melhorar a eficácia destas moléculas contra a artrite reumatoide. Os autores demonstraram uma diminuição significativa do edema da pata depois do tratamento com resveratrol e curcumina na forma nanoencapsulada comparado à forma livre, mas o tratamento da associação de ambos nanoencapsulados apresentou efeitos mais pronunciados, com acentuada redução do edema da pata. Além disso, os pesquisadores avaliaram níveis séricos de enzimas hepáticas para verificar possíveis efeitos colaterais do tratamento com esses polifenóis associados nanoencapsulados e observaram que nenhum tratamento alterou os níveis dessas enzimas quando comparado com o grupo controle (animais que não receberam CFA), sugerindo o potencial de segurança da presente formulação (CORADINI et al., 2015).

Ainda, Friedrich e colaboradores (2016) avaliaram o efeito de tacrolimus (TAC) na forma nanoencapsulada, um imunossupressor que tem sido relatado ter maior eficácia em modelo de artrite induzida por CFA em ratos. Apesar de apresentar eficácia terapêutica no tratamento da AR, diversos efeitos secundários, tais como nefropatia, hipertensão, distúrbios gastrointestinais e hiperglicemia estão fortemente associados com a utilização deste fármaco (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). Neste estudo, os autores injetaram CFA na pata de ratos e trataram esses animais com TAC na forma livre (não encapsulada) e na forma nanoencapsulada. Os animais tratados com TAC-nanoencapsulado apresentaram maior inibição do edema da pata quando comparado com o fármaco livre. Os autores associaram este resultado ao aumento da disponibilidade do fármaco e liberação sustentada no local inflamado, o qual foi permitido pelas nanocápsulas.

Também foram avaliadas concentrações séricas dos níveis de creatinina e glicose no soro desses animais. Como resultado, nenhum grupo apresentou alterações significativas nos níveis de creatinina, indicando segurança renal dos tratamentos. Em relação aos níveis séricos de glicose, foi observado um aumento significativo no grupo tratado com TAC na forma livre em comparação com TAC nanoencapsulado, isso ocorreu porque um dos efeitos colaterais à administração do TAC é hiperglicemia e nanoencapsulação do TAC impediu essa ocorrência. Assim, baseado em várias evidências experimentais pode-se perceber que o desenvolvimento de fármacos nanoencapsulados com menor ou nenhum efeito adverso e ainda com capacidade de diminuir a inflamação, pode ser muito importante para a terapia de diversas doenças inflamatórias.

3.5 Cetoprofeno

O cetoprofeno (ácido 3-benzoil- α -metilbenzenoacético, Fig.2) é um fármaco anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido propiônico, utilizado para o tratamento em longo prazo da artrite reumatoide e osteoartrite (HOAI et al., 2012). Também possui indicação no tratamento de dores musculares, tendinites, dismenorreia, entre outros processos inflamatórios. Este anti-inflamatório inibe a atividade da COX levando a uma diminuição da síntese de precursores das prostaglandinas e dos tromboxanos a partir do ácido araquidônico (COSTA et al., 2006). Além disso, inibe as lipoxigenases diminuindo assim, a síntese de leucotrienos impedindo a liberação de leucócitos na área inflamada resultando em uma menor destruição tecidual (KHAYRULLINA et al., 2014).

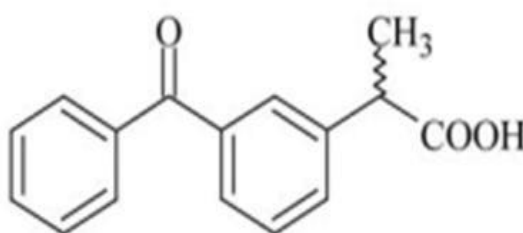


Figura 2. Estrutura do Cetoprofeno (Adaptado da Farmacopeia Brasileira, v. 2, 2010).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), apresenta-se como um pó cristalino, branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como acetona e etanol e possui pKa de 4,76. Ainda é rapidamente absorvido por via oral, com pico plasmático entre 0,5-2 horas. Apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas (99%) e é metabolizado em sua menor parte por hidroxilação e a maior parte pela conjugação com o ácido glicurônico. A dose comumente empregada por via oral situa-se entre 50 e 300 mg (dose máxima diária) (TARTAU, CAZACU, MELNIG, 2012).

Apesar da sua eficácia no tratamento da dor aguda e crônica, apresenta várias desvantagens, tais como meia vida plasmática curta, baixa biodisponibilidade, o que requer uso de doses significativamente mais elevadas ou várias administrações diárias, desencadeando sérios efeitos colaterais (HOAI et al., 2012). Um desses está relacionado aos efeitos lesivos que causam no trato gastrointestinal, que pode ser atribuído ao contato direto do fármaco com a mucosa gástrica após absorção, causando uma irritação no local, o que torna seu uso terapêutico limitado (FIORUCCI; ANTONELLI; MORELLI, 2001; MEEK et al., 2010; AL-SAEED, 2011). Esse contato direto com a mucosa está relacionado com a ionização do fármaco.

Por serem ácidos orgânicos fracos, em pH baixo, tornam-se moléculas não-ionizadas com características apolares, o que lhes permite atravessar a membrana mucosa. Ocorre uma mudança de pH ácido para neutro no interior da mucosa, fazendo com que o fármaco torna-se ionizado acumulando-se no interior das células epiteliais e causando danos às mesmas (FIORUCCI; ANTONELLI; MORELLI, 2001).

Além disso, apresenta atividade sistêmica, inibindo a COX-1 e COX-2, responsáveis pela produção de prostaglandinas. As prostaglandinas por sua vez agem inibindo secreção ácida do estômago, aumentando o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e promovendo a secreção de muco citoprotetor. Com isso, o cetoprofeno ao inibir síntese de prostaglandinas acarreta ao estômago uma maior suscetibilidade às lesões (FIORUCCI; ANTONELLI; MORELLI, 2001; MIZUSHIMA, 2010).

Pires e colaboradores analisaram o potencial analgésico, anti-edematogênico e antipirético do cetoprofeno na forma convencional em modelo de edema de orelha, bem como a atividade ulcerogênica sobre a mucosa gástrica. Constatou-se que este foi capaz de reduzir o edema, contudo demonstrou atividade ulcerogênica (PIRES, 2009). Nesse contexto, a utilização do cetoprofeno através de moléculas

nanoencapsuladas representa uma ferramenta promissora para a aplicação sítio direcionada de fármacos, constituindo uma estratégia terapêutica interessante para o tratamento de doenças inflamatórias (ULBRICH; LAMPRECHT, 2010).

Além disso, este fármaco tem sido incorporado a nanopartículas lipídicas sólidas preparadas a partir de uma mistura de cera de abelha e cera de carnaúba o que demonstrou uma eficiência de encapsulamento de 97% para o cetoprofeno, indicando uma boa compatibilidade deste com o núcleo lipídico das nanopartículas. De acordo com este estudo, o curto tempo de meia-vida, a baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e os efeitos adversos no trato gastrointestinal, tornam o cetoprofeno um bom candidato para a formulação de formas farmacêuticas de liberação controlada (KHERADMANDNIA; VASHEGHANI-FARAHANI; ATYABI, 2010). Também foi realizado em nosso grupo de pesquisa um estudo das nanocápsulas de cetoprofeno com objetivo de inibir seletivamente o crescimento de células tumorais *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que o cetoprofeno nanoencapsulado foi eficiente em diminuir o crescimento do tumor em um modelo pré-clínico de gliomas, tanto in testes *in vitro* quanto *in vivo* (SILVEIRA et al., 2013). Diante disso, a fim de minimizar os problemas do cetoprofeno na forma convencional, torna-se interessante nanoencapsular e analisar o potencial anti-inflamatório deste fármaco através de um protocolo de inflamação aguda e crônica utilizando modelo de edema de orelha em camundongos.

3.6 Modelo experimental de inflamação: edema de orelha em camundongos induzido por óleo de cróton

Diversos modelos animais de inflamação são utilizados para avaliar a eficácia de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças inflamatórias ou mesmo analisar fármacos que já estão no mercado como alternativa para melhorar a sua eficácia e biodisponibilidade (BERNARDI et al., 2009). Para isto é preciso modelos específicos que reproduzam as características básicas da maioria das reações inflamatórias, pois a etiologia e as manifestações clínicas diferem significativamente de uma doença para outra. Dentre os modelos de inflamação existentes encontra-se o edema de pata induzido pela carragenina, edema de pata induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA) muito utilizado para triagem de compostos para tratar a

artrite reumatoide, bem como o modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (BERNARDI et al., 2009; PIRES, 2009).

O modelo de edema de orelha é um modelo de inflamação cutânea que permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, sendo amplamente utilizado na triagem de compostos que pertencem à classe dos inibidores da COX e/ou lipoxigenases, como o cetoprofeno (GABOR, 2008). Para induzir o edema na orelha de camundongos, estudos geralmente utilizam o óleo de cróton (VAN, 1974; GABOR, 2008; PIRES, 2009), obtido da planta *Croton triglimum* L. e seu principal princípio ativo é o TPA (acetato de tetradecanoilforbol), um éster de forbol, potente agente flogístico e promotor tumoral, capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (GABOR, 2008).

A aplicação tópica deste óleo produz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema ainda nas primeiras duas horas, com posterior extravasamento celular que resulta em aumento da espessura da orelha. Ainda é capaz de estimular a liberação de vários mediadores da inflamação, como aminas vasoativas (histamina e serotonina) e derivados do ácido araquidônico (PIRES, 2009). Esta resposta inflamatória é normalmente quantificada pelo aumento no tamanho da orelha caracterizado pelo intenso edema sendo modulada por inibidores da cascata inflamatória, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (GABOR, 2008).

No entanto, o modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton consiste em um modelo rápido e simples, que requer pequenas quantidades de substâncias, fornece resultados reprodutíveis e rápidos. Dessa forma, é considerado um bom modelo para avaliar efeitos anti-inflamatórios de diferentes agentes terapêuticos (GABOR, 2008). No presente trabalho utilizou-se esse modelo para avaliar a eficácia anti-inflamatória do cetoprofeno nanoencapsulado com o objetivo de buscar novas tecnologias em formulações farmacêuticas com o intuito de minimizar o curto tempo de meia-vida, a necessidade de várias administrações diárias por via oral e a ocorrência de efeitos adversos gastrointestinais do cetoprofeno.

Manuscript Number:

Title: Ketoprofen-loaded rosehip oil nanocapsules decrease chronic inflammation in a mouse ear edema model induced by croton oil.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Ketoprofen
rosehip oil
nanocapsules
chronic inflammation
croton oil
ear edema.

Corresponding Author: Dr Elizandra Braganhol, PhD

Corresponding Author's Institution:

First Author: Priscila T Ramos

Order of Authors: Priscila T Ramos; Nathalia S Pedra; Mayara S. P Soares; Elita F da Silveira; Pathise S Oliveira; Fabiane B Grecco; Luísa C S Mariano; Luana M Ferreira; Daniele A Ribas; Mailine Gehrcke; Anelize de O.C. Felix; Francieli M Stefanello; Roselia M Spanevello; Leticia Cruz; Elizandra Braganhol, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: This study aimed to prepare nanocapsules containing ketoprofen using rosehip oil (RO) as lipid core and to evaluate anti-inflammatory activity in acute and chronic ear edema model in mice. Keto-NCs were developed using MCT (MCT-Keto-NC) or RO (Keto-NC) as lipid core. Physicochemical characterization, drug release, photostability and cytotoxicity assays were determined. Antiinflammatory activity of Keto-free (10 mg.kg⁻¹) or Keto-NC (2.5; 5; 10 mg.kg⁻¹) orally delivery were performed in acute and chronic ear edema induced by croton oil (CO). Edema histological characteristics were determined by HE and redox parameters were analyzed in blood plasma or erythrocytes. MCT-Keto-NC and Keto-NC did not exhibit differences on physicochemical parameters including size diameters, PDI, pH, Ketoprofen content and encapsulation efficiency. However, Keto-NC decreased drug photodegradation under UVC radiation when compared to MCT-Keto-NC. Keto-free or Keto-NC were not cytotoxic to keratinocyte cultures and produced equal inhibition of edema in acute protocol. Conversely, in chronic protocol, Keto-NC was more effective in reducing edema (~60-70% on 7-9th days) when compared to Keto-free (~40% on 8-9th days). This result was confirmed by histological analysis, which indicated edema and inflammatory infiltrate reduction. Sub-therapeutic Keto-NC dose (5 mg.kg⁻¹), significantly reduced edema when compared to control. Finally, Keto-free or Keto-NC exhibited similar effects on redox parameters, suggesting that the advantages associated to ketoprofen nanoencapsulation did not involve oxidative stress pathways. The results showed that Keto-NC was more efficient than Keto-free in reducing chronic inflammation. These data may be important for

development of strategies aiming chronic inflammatory disease treatment with lower adverse effects.

Suggested Reviewers: M M Zhang

Researcher, Georgia State University

mzhang21@gsu.edu

Researcher has experience in nanotechnology and biological tests in inflammatory disease models.

J B Calixto

Researcher, Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos - CIEnP

joao.calixto@cienp.org.br

Researcher is expertise in pharmacology and tests using acute/chronic edema models induced by chroton oil administration.

N A Peppas

Researcher, Institute for Biomaterials, Drug Delivery, and Regenerative Medicine, USA

peppas@che.utexas.edu

Researcher is expert in drug-loaded nanocapsule/nanogels development.

E L Maistro

Researcher, Universidade Estadual Paulista, Brazil

edson.maistro@marilia.unesp.br

Researcher is expert in evaluate in vitro and in vivo toxicity of drug-loaded nanoparticles.

Opposed Reviewers:

4. Manuscrito

Ketoprofen-loaded rosehip oil nanocapsules decrease chronic inflammation in a mouse ear edema model induced by croton oil

Priscila Treptow Ramos¹, Nathalia Stark Pedra¹, Mayara Sandrielly Pereira Soares¹, Elita Ferreira da Silveira¹, Pathise Souto Oliveira¹, Fabiane Grecco², Luísa Mariano², Luana Mota Ferreira³, Daniele Adriane Ribas³, Mailine Gehrcke³, Anelize de Oliveira Campello Felix⁴, Francieli Moro Stefanello¹, Roselia Maria Spanevello¹, Letícia Cruz³, Elizandra Braganhol^{*5}.

O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido:
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Ketoprofen-loaded rosehip oil nanocapsules decrease chronic inflammation in a mouse ear edema model induced by croton oil

Priscila T Ramos¹; Nathalia S Pedra¹; Mayara S. P Soares¹; Elita F da Silveira¹; Pathise S Oliveira¹; Fabiane B Grecco²; Luísa C S Mariano²; Luana M Ferreira³; Daniele A Ribas³; Mailine Gehrcke³; Anelize de O.C. Felix⁴; Francieli M Stefanello¹; Roselia M Spanevello¹; Leticia Cruz³; Elizandra Braganhol^{*5}.

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

⁵Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol (E-mail: ebraganhol@ufcspa.edu.br)

Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Rua Sarmiento Leite, 245 – Prédio Principal – sala 304

CEP: 90.050-170 Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 876

Abstract

The effects of systemic treatment with ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC) were compared with ketoprofen-free (Keto-free) in a model of acute and chronic edema in mice ears. The acute inflammatory process was performed over a 6 hour period. Firstly in which the croton oil was applied to the ears of the mice. After three hours of application, the animals were treated with either free or nanoencapsulated ketoprofen (10 mg/kg). The chronic inflammatory process was induced by the application of croton oil to the ears of mice on alternate days, from day 1 to day 9 of the therapeutic treatment and from day 4 to day 11 for a prophylactic protocol. The animals were treated with either ketoprofen free or nanoencapsulated for five days for a therapeutic protocol and 11 days for a prophylactic protocol. The dose-response experiment was performed using the chronic therapeutic protocol to assess whether Keto-NC could be effective at subtherapeutic doses. Keto-free or Keto-NC produced equal inhibition of croton oil-induced edema in the acute protocol. However, in the chronic therapeutic protocol, Keto-NC was more effective in reducing edema by 60%, 65% and 71% on days 7, 8 and 9, respectively, when compared to Keto inhibition (38% and 44% on days 8 and 9). This result was confirmed in the histological analysis, where it can observe the reduction of the epidermis, edema and inflammatory infiltrate. In addition, Keto-NC revealed that the dose 50% lower than the treatment considered for rats (5 mg kg⁻¹), was efficient in the significant reduction of edema induced by croton oil, showing even more efficacy of Keto-NC. The results showed that Keto-NC was more efficient than Keto-free in reducing the changes induced by a model of inflammation in the long term. These data may be important in the search for drugs with minor adverse effects for patients with chronic inflammatory diseases.

Key words: Ketoprofen; croton oil; nanocapsules; chronic inflammation; croton oil; ear edema.

1. Introduction

The inflammatory process is a defense mechanism of organism in response to tissue injury, whose main objective is remove noxious stimulus and promote tissue regeneration (1). However, if this process persists, cellular and tissue damage can occur and trigger serious chronic diseases, such as neurodegenerative pathologies, inflammatory, cardiovascular, emphysema and cancer (2). Reactive species are key signaling molecules that play a crucial role in the progression of inflammatory diseases. Radical superoxide anion ($\text{-O}_2^{\bullet-}$), hypochlorous acid (HClO), hydrogen peroxide (H_2O_2), are produced by inflammatory cells, primarily neutrophils, monocytes and lymphocytes as a defense mechanism against aggressive agents (3). However, when there is exacerbated production of these ERs, they cause tissue damage and oxidative stress. To control these damages, the formation of ERs is balanced by antioxidant defense system. This system includes antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and non-enzymatic antioxidants such as vitamins C and E, glutathione, and beta carotene which provide greater protection against oxidative stress by neutralized ERs effects in many physiological and pathological conditions (2).

Several chronic inflammatory diseases require the use of a number of drugs, including non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (4, 5). NSAIDs are a heterogeneous group of molecules with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. Ketoprofen (Keto-free) is a NSAID capable of inhibiting COX-1, COX-2 and lipoxygenase (6). However, Keto-free has some limitations as short plasma half-life, requiring several daily administrations and high dosage to achieve therapeutic efficacy. In addition, prolonged use of this drug is usually associated with serious adverse effects, such as gastroduodenal ulceration, gastrointestinal bleeding and intestinal perforation (7, 4, 8, 9). In order to minimize adverse effects and improve therapeutic efficacy, novel strategies with potential efficacy and safety have been extensively studied and involve drug delivery systems, especially nanocapsules (10, 11, 12, 13, 14). Nanocapsules can protect and increase drug stability, conferring properties of prolonged release (15), allowing the delivery of therapeutic agents specifically in active site of inflammation, thus increasing the therapeutic efficacy, besides reducing the adverse effects, as well as the dose administered (9).

In this context, to improve therapeutic efficacy, minimize adverse effects and thus also promote patient acceptance of the drug, it becomes important to evaluate the advantages of nanoencapsulated systems over the effects of Keto-free. Thus, the present study aimed to

characterize the physicochemical properties of ketoprofen nanoparticle formulation (Keto-NC) and to evaluate its pharmacological action in acute and chronic inflammation models. We further determined the gastrointestinal effects and parameters analyzed for oxidative stress compared to Keto-free treatment.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Keto-free (99% purity) was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Eudragit® S100 was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil), Span 80® (sorbitan monooleate), dichlorodihydro-fluorescein diacetate DCFH-DA, epinephrine, thiobarbituric acid (TBA), 5.50-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and croton oil (CO) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Tween 80® (polysorbate 80) purchased from Delaware (Porto Alegre, RS, Brazil). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fungizone, penicillin/streptomycin, 0.25 % trypsin/EDTA solution and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Trichloroacetic acid (TCA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Synth® (Brazil) and commercial kit for glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were obtained from Ransel® (Randox Lab, Antrim, UK).

2.2.1 Analytical procedures

The ketoprofen quantification was performed on a LC-10A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system (Shimadzu, Japan) equipped with a model LC- 20AT pump, an UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a Rheodyne valve sample manual injector with 20 µL loop. Separation was achieved at room temperature using a RP C18 Phenomenex column (250 mm×4.60 mm, 5 m; 110 Å) coupled to a C18 guard column. The isocratic mobile phase consisted of methanol and water pH 3.0 (70:30, v/v) at flow rate of 1 mL/min and ketoprofen was detected at 254 nm. The chromatographic conditions were adapted from Najmuddin and co-workers (2010) and the method was validated for determination of ketoprofen in nanocapsules according to the ICH guidelines. The method was found to be linear ($r = 0.999$), specific, accurate (96.55% to 100.84%),

precise (relative standard deviation was $< 2.66\%$) in the concentration range of 3.0–15.0 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2 Dissolution/ swelling experiments of polymer films

As a pre-formulation study, the possible interaction between the polymer and the oil was evaluated. Films of Eudragit® S100 were obtained from the solubilization of 2 g polymer in acetone and subsequent evaporation of this solvent at room temperature. Next, 100 mg films were weighed and kept submersed in the medium chain triglycerides or rosehip oil. At predetermined intervals, films were removed from the oil, carefully dried with absorbing paper, and weighed in an analytical balance in order to determine mass changes of the polymer, resulting from their interaction with oils.

2.2.3 Polymeric nanocapsule preparation

Nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method (16). For this, an organic phase constituted of ketoprofen (0.01 g), Eudragit® S100 (0.1 g), Span 80® (0.077 g), median chain triglycerides (NC-MCT) or rosehip oil (NC-RO) (330 μL) and acetone (27 mL) was kept for 60 min under moderate magnetic stirring at 40°C. After solubilization of all components, acetonetic phase was injected into 53 mL of an aqueous dispersion of Tween 80® (0.077 g) and magnetic stirring was maintained for 10 min. Then organic solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve a final volume of 10 mL and ketoprofen concentrations of 1.0 mg/mL. For comparison purposes, a blank nanocapsule suspension (NC-MCT-B or NC-RO-B) was formulated by omitting the drug. The formulations were prepared in triplicate.

2.2.4 Polymeric nanocapsule physicochemical characterization

The nanocapsules suspensions were characterized in terms of pH, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, drug content and encapsulating efficiency. pH values were obtained by directly immersing the electrode of a calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) in the formulations. Particle sizes and PDI were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potentials were measured by

microelectrophoresis by using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500).

Total drug content was measured by diluting an aliquot (90 μ L) of the sample in 10 mL ethanol followed by sonication for 30 min (9 μ g/mL). This procedure ensures the complete extraction of ketoprofen from nanocapsules suspension. Subsequently, samples were filtered through a 45 μ m membrane and injected into the HPLC system according to the method previously described. The encapsulation efficiency was determined by ultrafiltration/centrifugation technique. An aliquot of the samples was placed in a 10.000 MW centrifugal device (Amicon® Ultra, Millipore) and free drug was separated at $2200 \times g$ for 10 min. The ultrafiltrate analyzed by HPLC method. The difference between the total and the free concentration of ketoprofen, determined in the nanocapsules suspensions and in the ultrafiltrate, respectively, was calculated as the encapsulation efficiency (EE%).

2.2.5 Photostability study

In order to evaluate the influence of nanocapsule oil core in ketoprofen degradation, a drug dispersion in surfactants (1 mg/mL), NC-MCT and NC-RO were exposed to ultraviolet C radiation, as previously describe (17, 18), with minors modifications. For this, 200 μ L of the formulations were placed in quartz cuvettes and the submitted to UVC light (Phillips TUV lamp–UVC long life, 30 W) for 6 hours in a mirrored chamber (1 m $\times$ 25 cm $\times$ 25 cm) at a fixed distance of 20 cm from the light source. At predetermined intervals, aliquots were withdrawn and diluted in methanol to assay the drug remaining concentration in each sample by HPLC method. To refute the hypothesis of degradation by temperature or any others factors, dark controls were also carried out, where cuvettes were covered with aluminum paper.

2.2.6 *In vitro* drug release profile

Diffusion bag technique was employed to determine the nanocapsules suspensions *in vitro* release profile, according to the previously describe method (17, 18). For this, an aliquot of NC-TCM or NC-RO (1.5 mL) was placed in dialysis bags (MWCO 10.000, Spectra Por 7) and these systems were immersed in 150 mL of phosphate buffer pH 6.8 at 37°C under continuous stirring at 50 rpm. At predetermined intervals (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min), 1 mL of the dissolution medium was withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium, in order to maintain sink conditions. The experiment was carried out in

triplicate and the percentage of drug released was determined by the HPLC method described above.

In order to clarify the mathematical behavior and drug release mechanism data were fitted to first order ($\ln C = \ln C_0 - kt$) and to the Korsmeyer–Peppas model ($ft = a \cdot t^n$), respectively. In these equations, C is the concentration of the drug released at time t , C_0 is the initial concentration of the drug, k is the kinetic rate constant, a is a constant incorporating structural and geometric characteristic of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of drug release (19). To better understand the release mechanism by Korsmeyer–Peppas model $n = 0.43$ implies Fickian diffusion, while $n \geq 0.85$ is related to case II transport and values between the both limits indicate anomalous transport (20). The fit of the experimental data to the models was performed using the Scientist 2.0 software (Micromath, USA).

2.3 Effects of ketoprofen in solution and ketoprofen-loaded nanocapsules on keratinocyte cell viability

Human keratinocyte HACAT cell line was grown in the presence of DMEM high glucose supplemented with 10% FBS. Cells from passages 10 to 20 were used. HACAT cells were seeded at 1×10^3 cells/well in 96 well plates. The Keto-free was dissolved in cell culture-grade dimethylsulphoxide (DMSO) at stock concentration of 0.01%. Keto-NC (stock solution 1 mg/mL) and drug-unloaded nanocapsules (NC) were prepared as described above. Keto-free solution or Keto-NC were diluted in DMEM/10%FBS to obtain 1-100 μ M final concentrations. Cultures were exposed to treatments for 24 and 48 h. Appropriate controls containing 1% DMSO or NC were performed. Following treatments, cell viability assay was performed by the method of 3(4, 5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT). This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT and form a blue formazan product. MTT solution (sterile stock solution of 5 mg/mL) was added to the incubation medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were left for 90 min at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was then removed and plates were shaken with DMSO for 30 min. The optical density of each well was measured at 492 nm. Results were expressed as absorbance.

2.4 Analysis of ketoprofen free or loaded nanocapsules treatment in acute or chronic ear edema models in mice

2.4.1 Animals

C57/BL-6 male mice were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). Animals were maintained in a controlled temperature environment ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12/12 h light/dark cycle in a colony room with food (commercial chow) and water provided *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Committee on Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas under protocol number 3588-2016.

2.4.2 Induction of acute ear edema in mice and ketoprofen treatment

Mice were divided into six groups: group I (acetone 99.5%, AC); group II (croton oil, CO); group III (CO + canola oil, CA); group IV (CO + unloaded-nanocapsule, NC); group V (CO + Keto solubilized in CA, Keto-free) and group VI (CO + Keto-loaded-nanocapsules, Keto-NC). Acute inflammation was induced by topic application of 0.1mg/ μL per ear of CO. Briefly, 50 mg of CO was dissolved in 500 μL of vehicle acetone and a volume of 20 μL was applied inside of the ears (right and left) of mice with a micropipette (Group II) (22)Van, 1974). Animals of group I received only AC (control vehicle). Following edema induction, animals were treated orally (gavage) with Keto-free solution (10 mg/kg) or Keto-NC (10 mg/kg) for 6 h. Control groups received equivalent volumes of the vehicle applied CA or NC (Fig. 1a). After 6 h, animals were submitted to euthanasia and 6 mm diameter disks were removed from each ear with a hole punch. Edema was quantified by increasing the weight of the ears of mice after the inflammatory challenge using a BEL engineering® analytical balance. Results are reported as ear weight (mg).

2.4.3 Induction of chronic ear edema in mice and ketoprofen treatment – therapeutic protocol

The groups were divided as described above. Chronic inflammation was induced by topic application of 0.1 mg/ μL per ear of croton oil on alternated days for 9 days in the animals of groups II, III, IV, V and VI (Fig. 1b). Animals of group I were exposed only to AC (control

vehicle) (21). Animals of group V and VI were treated orally (gavage) from the fifth day of experimentation with Keto-free or Keto-NC (10 mg.kg), respectively. Control groups received equivalent volumes of the vehicle applied CA or NC. Edema was quantified daily using an electronic micrometer. On the 9th day of the experiment, animals were anesthetized with isoflurane (2%) and submitted to euthanasia by cardiac puncture and ear (6 mm), liver and kidney samples were removed and stored in 10% formaldehyde for histological analysis. Blood was also collected for biochemical assays.

2.4.4 Induction of chronic ear edema in mice and ketoprofen treatment – prophylactic protocol

Animals were divided into the same groups described above and pretreated three days with CA, NC, Keto-free and Keto-NC before edema induction with croton oil (Fig. 1c). Treatment was performed by gavage daily for 11 days. Chronic inflammation was induced four days after by topic application of 0.1 mg/ μ L per ear of croton oil. Edema was quantified daily using an electronic micrometer. On the 11th day of the experiment, animals were anesthetized with isoflurane (2%) and submitted to euthanasia.

2.4.5 Induction of chronic ear edema in mice - Dose response curve of Ketoprofen-loaded nanocapsules

The dose-response experiment was conducted to assess whether Keto-NC could be effective at subtherapeutic doses. Chronic therapeutic protocol was performed as described above. However, animals were treated orally from the fifth day of experience with Keto-NC at different concentrations (2.5, 5.0 or 10 mg.kg). Control group received equivalent volumes of the vehicle applied NC (Fig. 1d). Edema was evaluated daily with an electronic micrometer. On the 9th day of the experiment, animals were anesthetized with isoflurane (2%) and submitted to euthanasia.

2.5 Evaluation of gastrointestinal damage

For the evaluation of possible damage caused by treatments, gastrointestinal lesions were evaluated in all groups at the end of the chronic therapeutic protocol experiments as described by Guterres *et al.*, 2001 (22). For this purpose, after euthanasia, the stomach was opened

along the greater curvature and the regions of the intestine like duodenum, jejunum and ileum were slit open opposite the attached mesenteric tissue. The organs were macroscopically examined and the number and gravity of erosions were scored on a scale of five grades: grade 0 (no lesion); grade 0.5 (hemorrhagic point); grade 1 (ulcer length <2 mm); grade 2 (ulcer length > 2 mm); grade 3 (lesion with perforation and hemorrhage).

2.6 Histopathological analysis

Ears, liver and kidney were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4). The samples were processed for paraffin embedding, sectioned at 3- μ m thickness and stained with haematoxylin eosin. The ears were analyzed and scored according to the following parameters: (i) edema (1, light; 2, moderate; 3, marked); (ii) hyperplasia of the epidermis (1, light; 2, moderate; 3, marked); (iii) perichondrium involvement; (iv) cellular infiltration (1, light; 2, moderate; 3, marked); (v) ulceration (1, light; 2, moderate; 4, marked). The liver were analyzed and scored according to the following parameters: (i) degeneration (1, light; 2, moderate; 3, marked); (ii) location of degeneration; (iii) necrosis (presence; absence); (iv) inflammatory infiltrate (1, light; 2, moderate; 3, marked); (v) bleeding (presence; absence); (vi) bilestase (presence; absence). The kidney were analyzed and scored according to the following parameters: (i) degeneration (1, light; 2, moderate; 3, marked); (ii) necrosis (presence; absence); (iii) cylinders (presence; absence; hyaline; granular); (iv) tubular dilatation (presence; absence); (v) glomerulonephritis (1, light; 2, moderate; 3, marked); (vi) bleeding (presence; absence); (vii) fibrosis (presence; absence). Histological analyzes were performed in all groups of the chronic therapeutic protocol.

2.7 Oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes

2.7.1 Plasma and erythrocyte preparation

Blood was collected with anticoagulant heparin and immediately centrifuged at 3.500 *g* for 10 min at room temperature. Plasma was stored at -80°C for further biochemical analysis. After plasma removal, erythrocytes were washed with 0.9% saline and centrifuged at 3.500 *g* for 5 min. This process was performed three times. Erythrocytes were stored at -80°C for additional biochemical analysis. Analysis of oxidative stress parameters were performed in all groups of the chronic therapeutic protocol.

2.7.2 Reactive oxygen species (ROS) quantification

ROS formation was determined in erythrocytes according to Ali *et al.*, 1992 (23), with some modifications. This assay is based on the oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF), which measures the detection of intracellular RS. DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm 60 min after the addition of DCFH-DA to the medium. ROS levels were expressed as μmol per g of protein.

2.7.3 Total sulfhydryl content quantification

Total sulfhydryl content was measured in plasma according to Aksenov and Markesbery, 2001 (24). This method is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, forming an oxidized disulfide which gives rise to yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Plasma was added to PBS (pH 7.4) containing EDTA. The reaction was started by the addition of DTNB. Results were reported as nmol TNB per mg of protein.

2.7.4 Superoxide dismutase (SOD) activity

Total SOD activity was measured in erythrocytes by the method described by Misra and Fridovich, 1972 (25). This assay is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation to adrenochrome whose intermediate reaction is superoxide, which is scavenged by SOD. This process is measured in spectrophotometer adjusted at 480 nm. One SOD unit was defined as the enzyme amount to cause 50% inhibition of adrenaline autooxidation. Results were reported as units per mg of protein.

2.7.5 Catalase (CAT) activity

CAT activity was performed in erythrocytes by the method of Aebi, 1984 (26). The decomposition of 30 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) was continuously monitored with a spectrophotometer at 240 nm for 180 sec at 37°C. One unit of the enzyme is defined as the number of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity reported for units per mg protein.

2.7.6 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured in erythrocytes using a commercial kit (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, UK). GPx catalyzes glutathione (GSH) oxidation by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH the oxidized Glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. The decrease in absorbance at 340 nm was measured. The specific activity of GPx was reported as units per mg of protein.

2.7.7 Glutathione reductase (GR)

GR activity was measured in erythrocytes using a commercial kit (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, UK). GR catalyzes the reduction of oxidized glutathione (GSSG) through the oxidation of NADPH. The decrease in absorbance at 340 nm was measured. The rate of NADPH consumption, under saturation conditions, expresses the enzymatic activity. The specific activity of GR was reported as units per mg of protein.

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was carried using one or two-way ANOVA following by Tukey *post hoc* test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

3. Results

3.1 Dissolution/ swelling experiments of polymer films

Eudragit S100® films were placed in contact with both oil types used to prepare the formulations to verify a possible interaction between oil core with polymer coating nanocapsules. The initial mass of polymer in contact with MCT and RO was 19.0 ± 3.5 mg and 33.1 ± 1.0 mg, respectively. After 60 days in contact with the different oil types, Eudragit S100® films showed slight variations in their weight, presenting a mass of 18.0 ± 4.4 mg for the films in contact with MCT and 31.4 ± 1.4 mg for those in contact with RO. Statistical

analysis indicated that the observed differences were not significant ($P>0.05$), suggesting the feasibility of using MCT or RO in formulation of Eudragit S100[®] nanocapsules.

3.2 Polymeric nanocapsules preparation and physicochemical characterization

After preparation, nanocapsule suspensions were macroscopic homogeneous with milk appearance. In addition, it was observed a Tyndall effect, a bluish reflection resulting from the Brownian motion of the particles in suspension. Table 1 shows nanocapsule suspension physicochemical characteristics after preparation. Statistical analysis showed no significant difference between formulations in terms of mean size diameters, PDI, pH and drug content. Mean size diameters were in nanometric range (173 – 193 nm) and PDI values were below 0.2, indicating high homogeneity and low dispersity. pH values were in acid range and zeta potentials were negative. In addition, ketoprofen reduced in modulus zeta potentials values ($P<0.05$). Drug content was closed to theoretical (1 mg/mL).

3.3 Photostability study

After 6 h of exposure to UVC radiation, ketoprofen remaining content in NC-MCT and NC was 57% and 63%, respectively; while in nanodispersion only 29% of drug remained intact (Fig. 2). By One-way ANOVA analysis followed by *post hoc* Tukey's was observed a significant ketoprofen content decrease for all samples, nanocapsules and nanodispersion ($P<0.05$). However, both nanocapsule formulations kept ketoprofen content remaining higher than nanodispersion ($p<0.05$). Besides, through statistical analysis it was observed that NC, which contains RO, further increased UVC protection when compared to NC-MCT ($P<0.05$). Finally, for the dark control, ketoprofen concentration was close to 100%, which discards the influence of chamber temperature on drug degradation.

3.4 *In vitro* drug release profile

Release assays revealed a similar profile for all nanocapsules, regardless of the oil used (Fig. 3). It was found that approximately 100% of drug was released from nanocapsules in 4 h of experiment. Two-Way ANOVA analysis showed that only at 120 and 180 min the release profiles were significant different ($P<0.05$). Ketoprofen methanolic solution release was performed by Ferreira and co-workers and almost 100% of drug was released at 120 min.

Mathematical description of kinetic profiles was performed by first order monoexponential and Korsmeyer-Peppas models to understand the mechanism of drug release from nanocapsules. To choose the mathematical model that best fits the experimental points were observed the best graphical adjustments, as well as the highest correlation coefficients and model selection criterion (MSC) values obtained. According to correlation coefficients shown in Table 2, all the formulations presented a good fit to the equation describing a first-order kinetics order, since the correlation coefficients were close to 0.99. In this case, the release only depends on the drug concentration, with no burst effect (abrupt release), which indicates that drug is confined in the oily nucleus of nanocapsules. In relation to drug release mechanism, the exponent n obtained indicates that the drug release is caused by diffusion from the nanostructures, since the values were less than 0.43 in all cases.

3.5 Ketoprofen in solution and ketoprofen-loaded nanocapsules does not alter the viability of human keratinocyte cell line

Since both formulations developed expressed similar physicochemical characteristics and nanocapsules prepared with RO exhibited increased protection against drug photodegradation when compared to Keto-NC-MCT, such formulation was chosen to perform further experiments. Figure 4 shows the effects of the Keto-free or Keto-NC on human keratinocyte cell line viability. As could be observed both Keto-NC and Keto-free did not promote alteration in the keratinocyte cell growth following 24 and 48 h of treatment when compared to controls, DMSO and NC, indicating the safety of nanocapsule formulation.

3.6 Anti-inflammatory Ketoprofen activity is improved by nanoencapsulation

In order to evaluate whether nanoencapsulation improves Ketoprofen anti-inflammatory activity, acute ear edema was induced by CO topic administration and animals were treated by gavage with Keto-free or Keto-NC (10 mg.kg) (Fig. 1a; Fig. 5). Mice treated with equivalent volumes of CA or NC were considered controls. As expected, CO induced ~2.4 times ear edema when compared to AC control (vehicle), which was partially reverted by both Keto-free or Keto-NC treatment. No statistical difference was observed between Keto-free and Keto-NC in acute inflammation model.

As one of the advantages of nanoencapsulation is the controlled and tissue target drug release, we further compare the anti-inflammatory activity of Keto-free or Keto-NC in a chronic ear

edema model. Chronic protocol was performed by CO topic administration in alternate days; therapeutic, prophylactic and dose-curve response of Keto-free or Keto-NC was performed, as described in material and methods (Fig. 1b-d, respectively). In this model of chronic inflammation, CO induced 8 times ear thickness increase (0.160 mm) when compared to AC control (0.020 mm) ($P<0.001$; Fig. 6). Therapeutic treatment with Keto-free (10 mg.kg) reduced 38% and 44% the edema induced by CO at 8th and 9th days of treatment, respectively ($P<0.05$). By other hand, Keto-NC (10 mg.kg) was more effective, reducing edema in 60%, 65% and 71% from 7th, 8th and 9th days of treatment, respectively ($P<0.01$; Fig. 6a). Prophylactic treatment of Keto-free or Keto-NC (10 mg.kg) attenuated around ~40% edema induction, being statistically significantly different from 6th day of treatment when compared to the CO group ($P<0.05$, Fig. 6b). Furthermore, Keto-NC also prevented edema induction from 6th day, but its effect was higher when compared to Keto-free (51 to 77% reduction for 6th-11th days, respectively). Finally, a dose-curve response of Keto-NC was performed to evaluate if Keto-loaded NC are effective in reduce inflammation at sub-therapeutic dose. To this end, animals were exposed to increasing Keto-NC dose treatment (Fig. 6C).

Edema was effectively reversed in a dose-dependent manner by oral administration of Keto-NC at concentrations of 5 mg kg⁻¹ ($P<0.05$, Fig. 6c) and 10 mg.kg ($P<0.01$, Fig. 6c) in order to promote inhibition of edema formation. Keto-NC at the concentration 2.5 mg.kg and NC did not reduce edema. No significant difference was observed in control (CA) group when compared to the CO group.

Histological analysis of ears from animals submitted to Keto therapeutic protocol was performed by standard eosin-hematoxylin staining (Fig. 7). Our study also demonstrated that Keto-NC also reduces histological alterations induced by CO in mice ears. As can be observed in Figure 7 intense edema, increased inflammatory infiltration with predominance of neutrophils and extremely marked epidermal hyperplasia in the CO group when compared to the acetone group that did not present these alterations (Fig. 7). These results were also repeated in the CA and NC controls (Fig. 7). Keto-free reduced neutrophil infiltration, epidermal hyperplasia and edema moderately compared to CO (Fig. 7). However, Keto-NC significantly reduced all these parameters when compared to CO and Keto-free (Fig. 7; Table 3).

3.7 Ketoprofen in solution and ketoprofen-loaded nanocapsules does not cause gastrointestinal damage in mice

No signs of bleeding, ulceration or perforation were found in stomach and intestine of animals of all groups evaluated in this study (data not show).

3.8 Oxidative stress parameters

As oxidative stress is involved in inflammatory processes, we evaluated if CO exposition could modulate these parameters and whether Keto-free or Keto-NC anti-inflammatory activity differentially modulate redox parameters. In a general way, CO modulated the redox parameters analyzed and Keto treatment reestablished CAT and GPx activities to control levels. However, Keto-free or Keto-NC had similar effects, indicating that nanoencapsulation did not further improve Keto antioxidant activity. Total SH content was significantly reduced (~2 times) in the plasma of Keto-free and/or Keto-NC treated mice ($P<0.05$, Fig. 8) when compared to the AC. No changes were observed in ROS levels in plasma of the all groups evaluated in this study. Changes in antioxidant enzyme activity was observed in erythrocytes. First, CO induced an increase of ~1.3 times of SOD activity when compared to AC control group, which was not reversed by Keto-free or Keto-NC treatment (Fig. 8c; $P<0.05$). In addition, CO reduced 2 times CAT activity when compared to AC group (Fig. 8D). Keto-free and Keto-NC treatment reestablished CAT activity, promoting 1.5 times increase when compared to control. The same profile was observed for GPx activity (Fig. 8e). The GR activity in erythrocytes was not altered in any of the experimental groups evaluated.

4. Discussion

Nanoencapsulated systems have contributed to suppress and reduce inflammation, since in inflamed tissue there is an increase in blood flow as well as increased permeability of the inflamed site (27, 28). The nanocapsules can reach the site of action more easily because of their reduced size and by a prolonged release profile, which favors uniform distribution and prolonged effect of drugs (9). In this line, in the present study we evaluated the anti-inflammatory potential of nanocapsules of the Keto-free, searching for new technologies in pharmaceutical formulations with the purpose of minimizing the short half-life, the need of several daily oral administrations and the occurrence of gastrointestinal adverse effects of this

anti-inflammatory. In our study we performed a detailed evaluation of the nanocapsules suspension such as pre-formulation analysis, physicochemical characterization, photostability and *in vitro* Keto-free release.

Firstly, it was determined the compatibility between polymer and oils employed as oily cores. By the dissolution and swelling assay of the polymer films it is possible to observe that Eudragit S100[®]/RO and Eudragit S100[®]/MCT combination could be suitably to form nanocapsules, without prejudice to their wall-core structure since they are oils widely used as the core of these systems for solubilize a wide variety of substances (29). Our results indicate that RO was considered a suitable material for the development of Eudragit S100[®] nanocapsules as well MCT, since no swelling/dissolution of polymer was observed. This result corroborates the study by Gehrcke *et al.*, 2017 (29) who verified, through dissolution/swelling tests of Eudragit RS100[®] films, that it does not undergo mass change when in contact with RO. In addition, after preparation, all nanocapsules suspension showed a tyndall effect, that is, a bluish reflection which is result of the suspended particles brownian motion. The drug content was very close to the theoretical concentration (1.0 mg/ml), indicating no loss or degradation of the drug during the preparation process.

As well as other studies involving the NSAIDs association with polymeric nanoparticles, the Keto-NC rate was higher than 90%, due to the high solubility of the drug in the oily nucleus of the nanocapsules (10, 30). The polydispersity was less than 0.2 for most formulations, indicating high homogeneity and low dispersity. The particle size was in the nanometric range 173 to 193 nm such results are compatible with other colloidal systems prepared by the interfacial deposition of preformed polymers method (11, 31). Taking into account that Keto-free is a photolabile drug (32) and considering that nanocapsules can improve the photostability of drugs (33) it was conducted a comparative study with UVC radiation, that is considered a drastic condition. In addition, it is possible to observe greater protection for the drug in the photostability test, conferred by the nanocapsules containing the RO, which can be justified by the high antioxidant power of this oil, which is rich in unsaturated fatty acids, such as oleic, linoleic and linolenic (34). These results corroborate with the studies of Gehrcke *et al.*, 2017 (29) that observed the protection effect against UVC radiation was higher than RO NCs than MCT NCs. To confirm this protective effect was performed tested *in vitro* cytotoxicity that allowed to observe a survival of keratinocyte cells of the Hacat line as four concentrations of Keto-free and Keto-NC in the two exposure times, 24 and 48 hours, evidencing the protective effect conferred by drug encapsulation.

In next set of experiments, we evaluate the anti-inflammatory effect of Keto-NC in a chronic model of inflammation in ear edema. It was possible to observe that the topical application of croton oil in all the experiments promoted an increase in the ears size due to the formation of edema and an intense leukocyte infiltration and also triggers an alteration growth and differentiation of keratinocytes (35). According to this protocol it was still possible to observe the great advantage of drug use in the nanoencapsulated form since the Keto-NC significantly decreased the edema in the ears of mice with more efficiency this is because the drug in the nanoencapsulated form due to its nanometric size can selectively accumulate in the inflamed region being restricted to the sites of action in the tissue and the target cells of the inflammation because of its prolonged release profile (27,28). However, it can not be observed with the drug in free form, since Keto-free has a short half-life (0.5-2 hours), being rapidly excreted (36). In addition, Keto-free as it is administered in the commercially available formulations, is available to target the blood from the site of administration and may reach other tissues which have not been affected and cause serious undesirable effects such as ulceration gastroduodenal, gastrointestinal bleeding and intestinal perforation (7, 4, 8).

An important aspect to be observed is that in our study the Keto-free and Keto-NC not cause macroscopic damage in stomach and intestine and histological changes in kidney and liver in our experimental protocol (data not show). The absence of damage may have been attributed to the treatment time of our work, since literature data has shown that adverse effects of Keto-free occur over longer periods. However, it is important to emphasize that Bernardi et al., 2009 (10) has shown that indomethacin (the NSAID of the same keto class) when administered in nanocapsules during 21 days of treatment reduces gastrointestinal effects in a model of paw edema. In addition, in a previous study by our research group (30) Silveira et al., 2013), we used Keto-free and Keto-NC as an alternative to treatment of malignant brain tumor model in vivo glioma to which we evaluated after 15 days of treatment of these animals the activity of ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) (markers of liver damage) and creatinine and urea serum levels (markers of kidney damage) and observed that Keto-free, Keto-NC, as well as NC did not promote systemic toxicity in these Animals. Take together, these findings demonstrate the beneficial potential of nanoencapsulated drugs in reducing side effects.

Our results can be explained by the characteristics of the polymer used in our study, the polymer Eudragit® S100, considered a gastroresistant polymer that allows the release of Keto-free in a more distal portion of the TGI, protecting the mucosa of the stomach and reducing the adverse effects caused by the direct contact of Keto-free with the mucosa of the

stomach (37), thus indicating that treatment with nanocapsules based on this polymer provides safety. In addition, these results agree with the histological analysis performed by this study, as it may observe a greater reduction of edema when the rats were treated with Keto-NC when compared to Keto-free. And a decrease in inflammatory infiltrate can also be seen to show more advantages of using Keto-NC.

In the present study we also evaluated the effects of Keto-NC and Keto-free in oxidative stress parameters in a model of ear edema. Our results shows that CO alter the oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes from mice. An possible explanation for this findings is that during inflammatory process induced by CO occurs the recruitment of mainly neutrophils, monocytes and lymphocytes at the lesion site that are involved with the production of ROS (3). However, our results did not cause changes in ROS production and total sulfhydryl content, but produced changes in the enzymatic antioxidant parameters. It was possible to observe an increase in the enzyme SOD, which is responsible for catalyzing the dissimulation of the superoxide radical in H_2O_2 and O_2 and the treatments with Keto-free and Keto-NC did not reverse this fact, generating more H_2O_2 in the medium.

However, it can be observed that Keto-free and Keto-NC treatments increased CAT and GPX, enzymes responsible for hydrolyzing this H_2O_2 to control the oxidative process (3). As this increased enzymes caused them to hydrolyze H_2O_2 in the medium, preventing oxidative damage by H_2O_2 . The Keto-free may interfere with antioxidant parameters that are probably involved in the control of inflammation, but Keto-NC does not improve these effects, suggesting that the benefits in reducing edema when in the nanoencapsulated form are associated with other mechanisms of action that are not via antioxidant.

In addition, we performed a prophylactic protocol with the objective of evaluating an advantage of the application of Keto-NC for the prevention of chronic inflammatory pathologies such as rheumatoid arthritis and Crohn disease since they are dysfunctions that have no cure and that affect the quality of life of patients. The results obtained in the prophylactic treatment showed a 10 mg.kg Keto-NC profile in inhibiting the formation of ear edema that is, before starting the inflammatory process, indicating that this drug has an anti-edema-like effect in this model. These results indicate the potential advantages of using Keto-NC for the treatment of chronic inflammatory diseases, which require continuous administration of the drug. This result is in agreement with the literature which reports to other biological models and to other drugs (10, 31, 38) that the nanoencapsulated systems facilitate the passage of bioactive molecules through the cellular barriers, increasing the directed site release and modifying the release profile (15). Moreover, according to the

literature, the drugs when administered in the nanoencapsulated form present therapeutic action at lower doses when compared to the same drug in the free form (39). To test this hypothesis, a dose-response experiment was conducted to evaluate whether Keto-NC could be effective at subtherapeutic doses and according to the result presented Keto-NC revealed that a dose 50% lower than considered therapeutic for mice (5 mg.kg) (40), was efficient in significantly reducing edema induced by croton oil. This result is in agreement with that reported in the literature, since the main advantage of nanocapsules over conventional drugs is the possibility of improving the selective release of drugs to the site of action, regardless of the route of administration (28). A plausible explanation for these effects is that nanoencapsulation improves drug efficacy and bioavailability (41) providing more sustained drug release to the inflamed site.

5. Conclusions

Therefore, it is important to study nanocapsules since Keto-NC significantly reduced edema, the presence of inflammatory infiltrate, epidermal hyperplasia, as well as did not cause gastrointestinal and hepatic damage showing the therapeutic potential of Keto-NC. Such results indicate the therapeutic potential of such formulation with the objective to present the patients with chronic diseases drugs with lower adverse effects and which can be administered in smaller doses without losing the anti-inflammatory potency and possibly, allied to an improved gastrointestinal safety due to the extended release profile.

References

- (1) J.E. Linley, K. Rose, L. Ooi, N. Gamper, Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception, *Eur. J. Physiol.* 459 (2010) 657-669.
- (2) A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur. J. Med. Chem.* 5 (2015) 55-74.
- (3) S.K. Biswas, Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016) 1-9.
- (4) I.L. Meek, M.A.F.J. Van de laar, E.H. Vonkeman, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks, *Pharmaceuticals* 3 (2010) 2146-2162.

- (5) S.S. Laev, N.F. Salakhutdinov, Anti-arthritic agents: Progress and potential, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23 (2015) 3059-3080.
- (6) V.R. Khayrullina, I.A. Taipov, A.V. Veselovsky, D.S. Shcherbinin, A.Y. Gerchikov, New Inhibitors of 5-Lipoxygenase Catalytic Activity Based on 2-(3-Methylphenyl)propanoic Acid and 4-Substituted Morpholine Derivatives, *Biochemistry* 79 (2014) 476-484.
- (7) S. Fiorucci, E. Antonelli, A. Morelli, Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastrophaty, *Digest and liver disease* 33 (2001) 35-43.
- (8) A. Al-saeed, Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, *Oman Medical Journal* 26 (2011) 385-391.
- (9) C.T. Pham, Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3 (2011) 607-619.
- (10) A. Bernardi, A.C.C.V. Zilberstein, E. Jager, M.M. Campos, F.B. Morrone, J.B. Calixto, et al, Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats, *British Journal of Pharmacology* 158 (2009) 1104-1111.
- (11) C.E. Mora-huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 113-142.
- (12) J.G. Froder, D. Dupeyrón, J.C.T. Carvalho, E.L. Maistro, In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit® L 100 nanocapsules, *Genet. Mol. Res.* 15 (2016).
- (13) B. Genari, V.C. Leitune, D.S. Jornada, M. Camassola, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, et al, Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin, *Clin. Oral Investig.* 21 (2017) 437-446.
- (14) M. Zhang, E. Viennois, M. Prasad, Y. Zhang, L. Wang, Z. Zhang, et al, Edible Ginger-Derived Nanoparticles: A Novel Therapeutic Approach for the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer, *Biomaterials* 101 (2016) 321-340.
- (15) L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 557-570.
- (16) H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) R1-R4.
- (17) L.M. Ferreira, V.F. Cervi, M. Gehrcke, E.F. da Silveira, J.H. Azambuja, E. Braganhol, et al, Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: selective

- antiglioma formulation for intravenous administration, *Colloids Surf B Biointerfaces* 130 (2015) 272–277.
- (18) L.M. Ferreira, M.H. Sari, V.F. Cervi, M. Gehrcke, A.V. Barbieri, V.A. Zborowski, et al, Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug, *Colloid Surf B Biointerfaces* 144 (2016) 214–21.
- (19) L. Cruz, L.U. Soares, T. Costa, G. Mezzalana, N.P. da Silveira, S.S. Guterres, et al, Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers, *Int. J. Pharm.* 313 (2006) 198–205.
- (20) R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35.
- (21) P.L. Stanley, S. Steiner, M. Havens, K.M. Tramposh, Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Skin Pharmacol.* 4 (1991) 262–271.
- (22) S.S. Guterres, C.B. Muller, C.B. Michalowski, A.R. Pohlmann, T. Dalla Costa, Gastro-intestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres, *STP Pharma. Sci.* 11 (2001) 229–233.
- (23) S.F. Ali, C.P. Lebel, S.C. Bondy, Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, *Neurotoxicology* 13 (1992) 637–648.
- (24) M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- (25) H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- (26) H. Aebi, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- (27) W. Ulbrich, A. Lamprecht, Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases, *J R Soc Interface* 7 (2010) 55–66.
- (28) V.M. Golveia, S.A.C. Lima, C. Nunes, S. Reis, Non-Biologic Nanodelivery Therapies for Rheumatoid Arthritis, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 1701–1721.
- (29) M. Gehrcke, L.M. Giuliani, L.M. Ferreira, A.V. Barbieri, M.H. Sari, E.F. da Silveira, et al, Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 74 (2017) 279–286.
- (30) E.F. da Silveira, J.M. Chassot, F.C. Teixeira, J.H. Azambuja, G. Debom, F.T. Beira, et al, Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro

and in preclinical model of glioblastoma multiforme, *Invest. New Drugs* 31 (2013) 1424-1435.

(31) R.B. Friedrich, K. Coradini, F. Fonseca, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, Lipid-Core Nanocapsules Improved Antiedematogenic Activity of Tacrolimus in Adjuvant-Induced Arthritis Model, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16 (2016) 1265–1274.

(32) S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes, *J. Chromatogr. A.* 1218: (2011) 9260–9268.

(33) M.C. Fontana, K. Coradini, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, R.C. Beck, Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5: (2009) 254-263.

(34) D. Franco, M. Pinelo, J. Sineiro, M.J. Núñez, Processing of *rosa rubiginosa*: extraction of oil and antioxidant substances, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 3506-3512.

(35) M. Gabor, Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A, *Inflammation Protocols* 225 (2008) 129-131.

(36) L. Tartau, A. Cazacu, V. Melnig, Ketoprofen-liposomes formulation for clinical therapy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2499–2507.

(37) G.F. Palmieri, S. Michelini, P.D. Martino, S. Martelli, Polymers with pH-dependent solubility: Possibility of use in the formulation of gastroresistant and controlled-release matrix tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 837-45.

(38) K. Coradini, B.R. Friedrich, N.F. Fonseca, S.M. Vencato, D.F. Andrade, M.C. Oliveira, et al, A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin coencapsulated in lipid-core nanocapsules: in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Sci.* 78 (2015) 163-170.

(39) A.H. Faraji, P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 2950–2962.

(40) J.C. Zanini Jr, Y.S. Medeiros, A.B. Cruz, R.R.A. Yunes, J.B. Calixto, Actions of compounds from *Mandarinella velutina* on croton oil-induced ear edema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Phytother. Res.* 6 (1992) 1-5.

(41) S.S. Santos, A. Lorenzoni, L.M. Ferreira, J. Mattiazzi, A.I.H. Adams, L.B. Denardi, et al, Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 33 (2013) 1389-1394.

Legend to Figures

Figure 1. Treatment schemes in model of ear edema in mice. a) acute protocol; b) chronic therapeutic protocol; c) chronic prophylactic protocol; d) dose response curve using chronic therapeutic protocol.

Figure 2. Remaining concentration of Keto-free from nanocapsules and nanodispersion after UVC radiation exposure. The asterisks denote significant level between time 0 h and time 6 h ($P < 0.05$) and the sharp denotes significant level between both formulations and nanodispersion at time 6 h ($P < 0.05$), by two-way ANOVA analysis, followed by the Tukey test. Statistical analysis did not demonstrated difference between the nanocapsules at time 6 h.

Figure 3. Drug release profiles of Keto-free from nanocapsules. Asterisk denotes significant level between NC-MCT and NC-RO ($P < 0.05$), analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test.

Figure 4. Comparative cytotoxicity of ketoprofen in solution (Keto-free) and ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC) against cell line of human keratinocytes (HACAT). Cell viability at 24 h (a) and cell viability at 48 h (b). C (DMSO); Keto-free (ketoprofen dissolved in DMSO); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules). The values representing the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post hoc comparisons (Tukey test).

Figure 5. (a) Weight of the ears of C57/BL6 mice submitted to acute treatment with Keto and Keto-NC. The result was expressed in milligrams (mg).

Figure 6. (a) Thickness of the ears of C57/BL6 mice submitted to therapeutic treatment with Keto-free and Keto-NC. * Different from the CO group ($P < 0.05$); *** Different from the CO and Keto-free ($P < 0.01$). (b) Thickness of the ears of C57/BL6 mice submitted to prophylactic treatment with Keto-free and Keto-NC. ** Different from the CO group ($P < 0.05$); *** Different from the croton oil and Keto-free ($P < 0.01$). (c) Dose-response curve of ketoprofen-loaded nanocapsules in a chronic inflammation model. **, *** Different from the CO group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Legends: Acetone group (AC); croton oil group (CO); ketoprofen group (Keto-free, 10 mg kg^{-1}); ketoprofen-loaded nanocapsules group (Keto-NC, 10 mg.kg^{-1}) and ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC) in doses 2.5 mg kg^{-1} , 5.0 mg kg^{-1} and 10 mg kg^{-1} . The result was expressed in millimeters in protocols therapeutic, prophylactic and dose-response curve.

Figure 7. *In vivo* evaluation by histological analysis of Keto-NC compared to Keto-free. Histological sections of ears of C57/BL-6 mice stained with hematoxylin & eosin. a) acetone group (AC); b) croton oil group (CO); c) canola oil (CA) group; d) drug unloaded nanocapsules (NC); e) ketoprofen group (Keto-free) and f) ketoprofen-loaded nanocapsules group (Keto-NC). H (epidermal hyperplasia), I (inflammatory infiltrate) and E (edema).

Figure 8. Total sulfhydryl content (a) and ROS (b) levels in plasma of young mice 8 weeks after treatment with ketoprofen in solution (Keto) and/or ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Thiol content levels were reported as nmol TNB per mg protein and ROS were expressed as $\mu\text{mol DCF}$ per mg of protein. * $P < 0.05$ when compared to acetone group (AC). Superoxide dismutase (a), catalase (b), glutathione

peroxidase (c) and glutathione reductase (d) activities in erythrocytes of young mice 8 weeks after treatment with ketoprofen in solution (Keto) and/or ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC). Bars represent mean $\pm$ SEM. SOD, CAT, GPx and GR activities were reported as units per mg protein. * $P < 0.05$ when compared to acetone group (AC), ### $P < 0.01$ when compared to croton oil group (CO).

Table 1. Polymeric ketoprofen nanocapsule physicochemical characteristics.

Formulations	Mean particle size (nm)	PDI	Zeta potentials (mV)	pH	Drug content (mg/mL)
NC-MCT-Keto	193 ± 9	0.19 ± 0.01	-8.7 ± 1.5	4.3 ± 0.3	0.99 ± 0.03
NC-MCT	180 ± 13	0.13 ± 0.03	-18.4 ± 4.7*	4.7 ± 0.5	-
NC-Keto	186 ± 14	0.19 ± 0.03	-12.9 ± 2.6	4.2 ± 0.2	1.00 ± 0.02
NC	173 ± 4	0.13 ± 0.02	-21.2 ± 0.2*	4.4 ± 0.2	-

NC-MCT; NC: unloaded-drug nanocapsules; NC-MCT-Keto, NC-Keto: Ketoprofen-loaded nanocapsules prepared with median chain triglycerides or rosehip oil, respectively.

Table 2. Mathematical modeling parameters

Formulations	NC-MCT-Keto	NC-Keto
First Order		
R	0.9973±0.0007	0.9838±0.0063
$k (h^{-1})$	0.0263±0.0024	0.0272±0.0016
Korsmeyer-Peppas		
R	0.9514±0.0111	0.9685±0.0045
A	0.2340±0.0509	0.2109±0.0029
N	0.2796±0.0359	0.2972±0.0016

Table 3. Evaluation of therapeutic Keto-free or Keto-NC treatment on histological characteristic of ears from mouse submitted to chronic inflammation model.

Edema (%)				
Groups	Absent	Light	Moderate	Intense
AC	30.0	20.0	20.0	30.0
CO	0	53.3	20.0	26.7
CA	0	66.7	25.0	8.3
NC	0	40.0	33.3	26.7
Keto-free	0	42.9	50.0	7.4
Keto-NC	0	59.0	41.2	0

Epidermis hyperplasia (%)				
Groups	Absent	Light	Moderate	Intense
AC	100	0	0	0
CO	0	6.7	13.3	80.0
CA	0	0	17.0	83.0
NC	0	0	60.0	40.0
Keto-free	0	21.4	50.0	29.0
Keto-NC	0	23.5	58.8	17.7

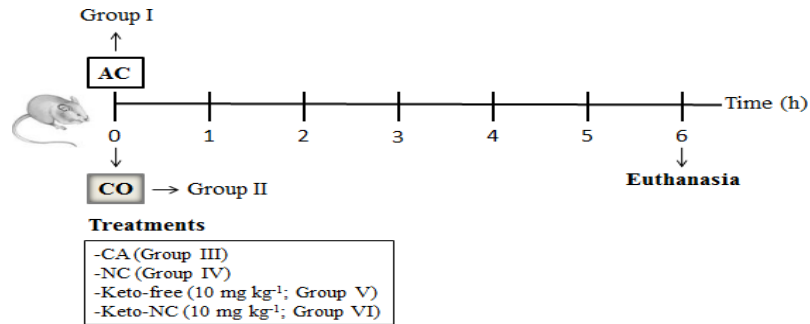
Inflammatory infiltrate (%)				
Groups	Absent	Light	Moderate	Intense
AC	100	0	0	0
CO	0	0	20.0	80.0
CA	0	0	16.7	83.3
NC	0	20.0	27.0	53.3
Keto-free	0	7.1	71.4	21.4
Keto-NC	0	17.7	41.2	41.2

Animals were submitted to chronic ear edema model and treated with Keto-free or Keto-NC as described in materials and methods. Histological variables were analyzed by a pathologist in a blinded manner and expressed as absent, light, moderate and intense. At least 10 animals per group were analyzed. Values represent the percentage of edema; hyperplasia of the epidermis and inflammatory infiltrate. AC (acetone); CO (croton oil); CA (canola oil); NC

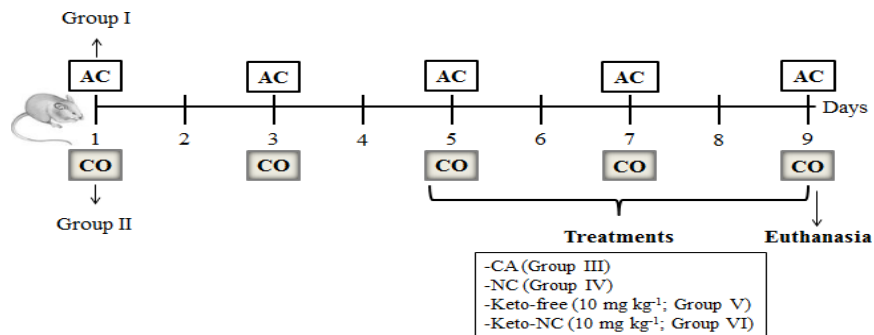
(drug-unloaded nanocapsules); Keto-free (ketoprofen dissolved in canola oil); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules).

Figures

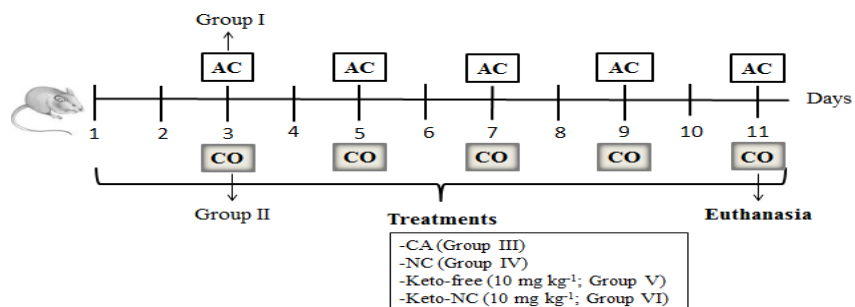
a. Acute ear edema



b. Chronic ear edema – Ketoprofen therapeutic treatment



c. Chronic ear edema – Ketoprofen profilatic treatment



d. Chronic ear edema – Ketoprofen dose-response treatment

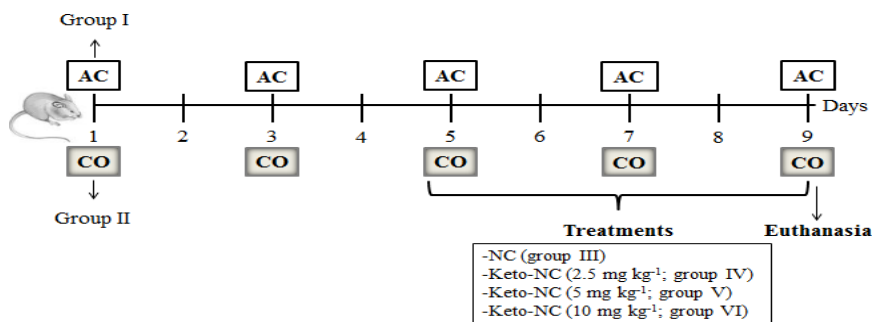


Figure 1

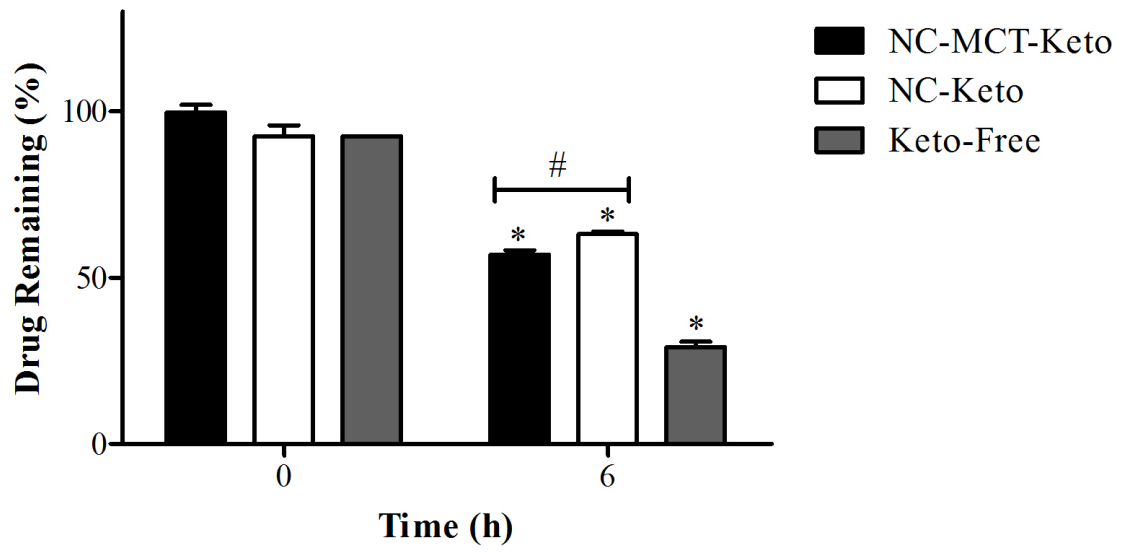


Figure 2

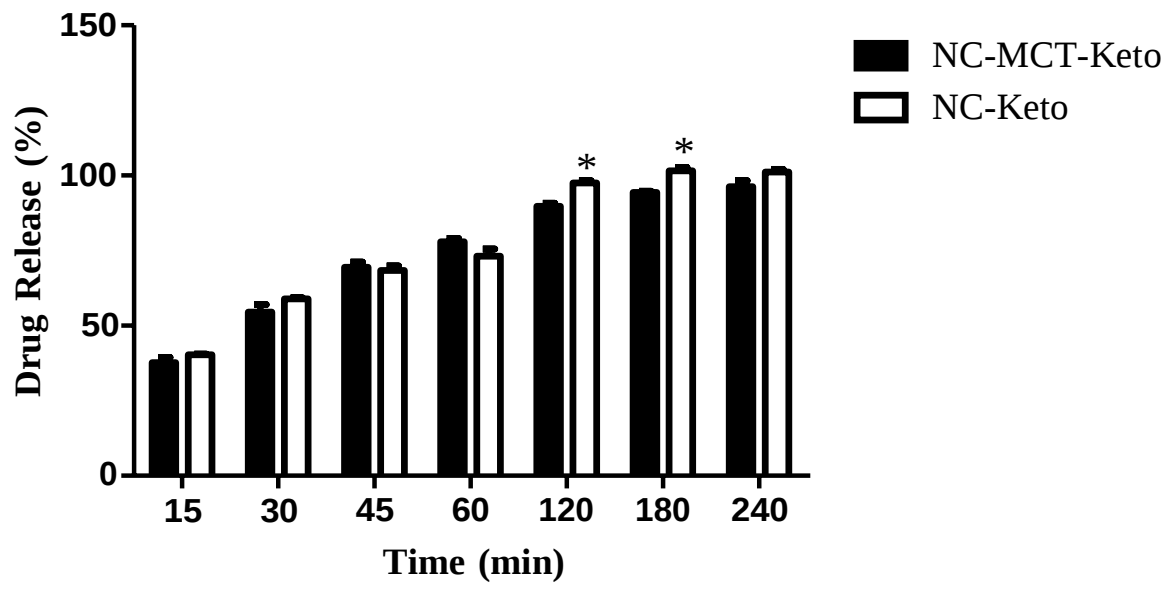


Figure 3

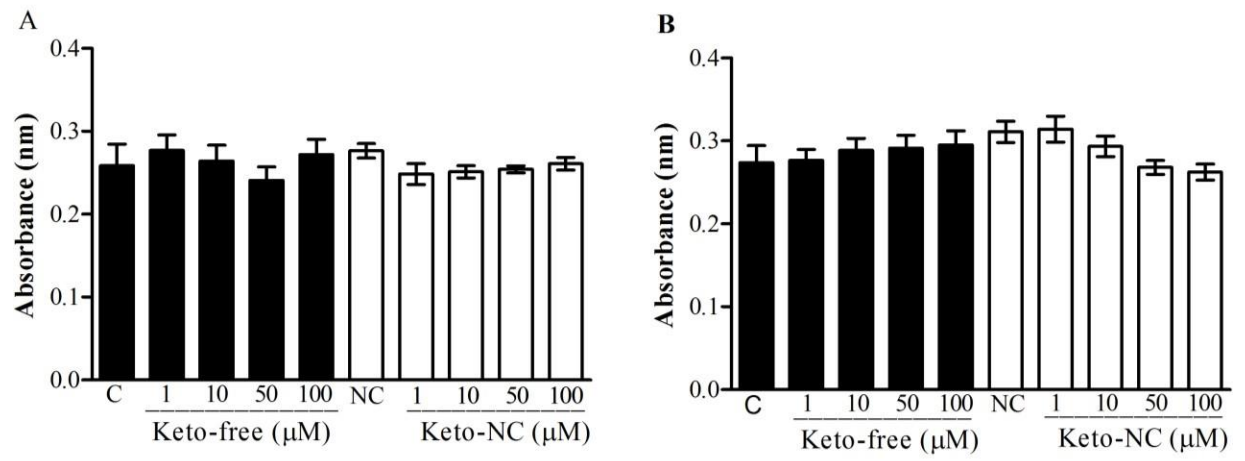


Figure 4

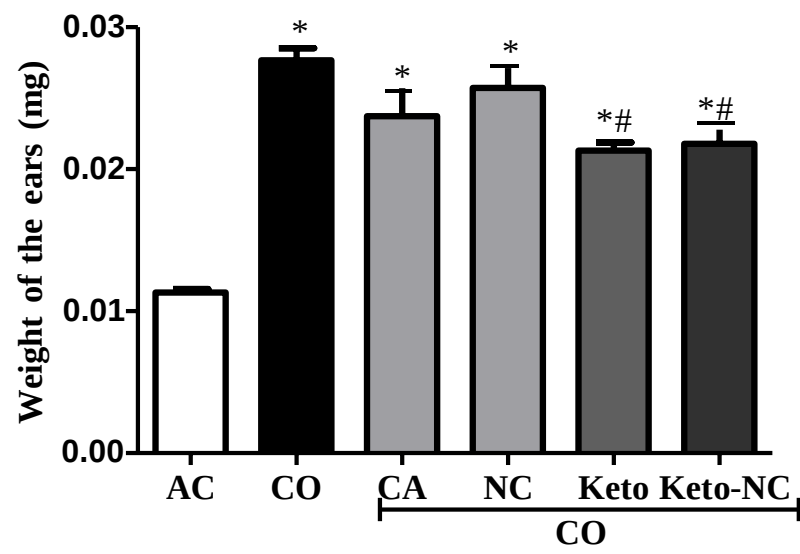


Figure 5

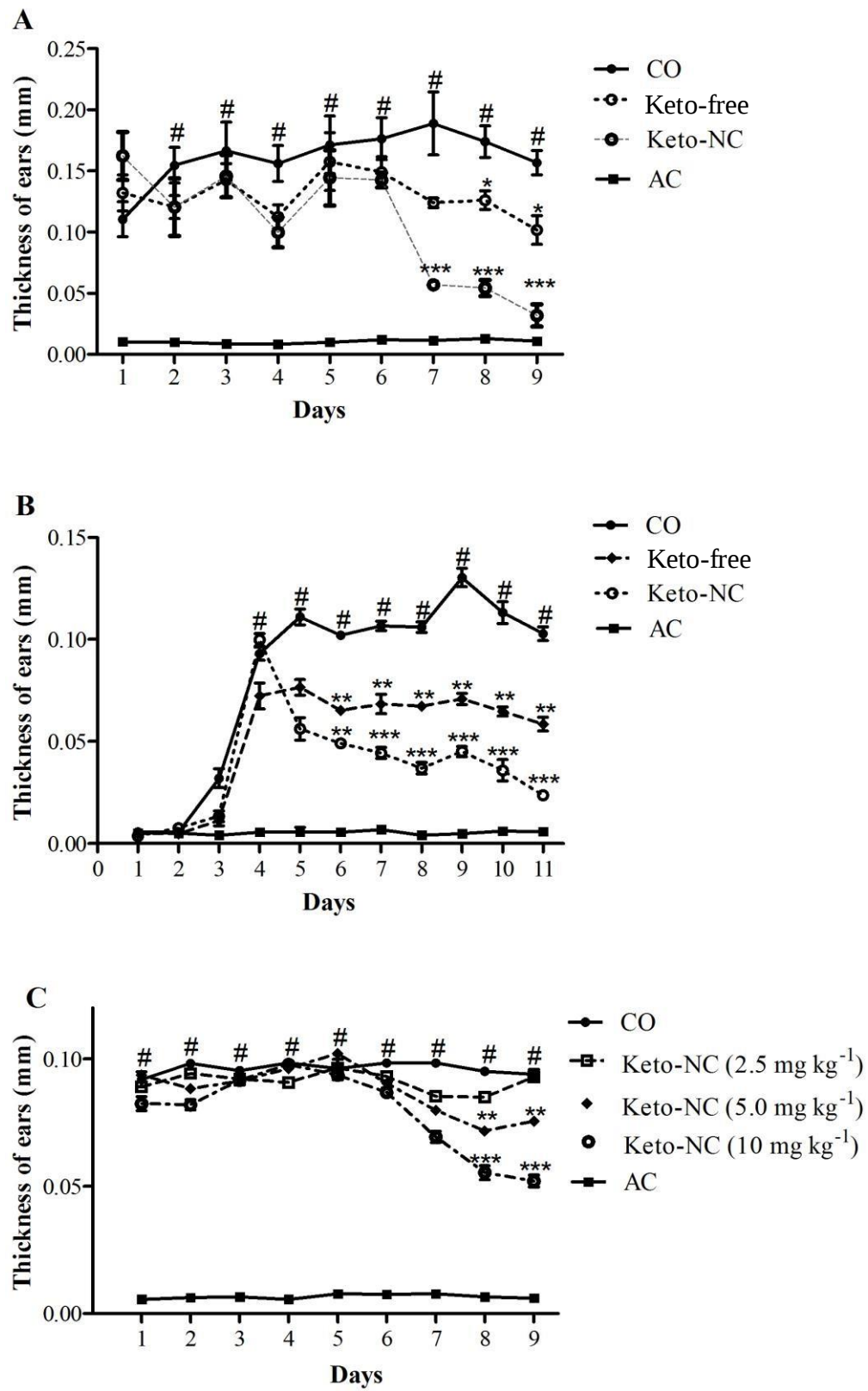


Figure 6

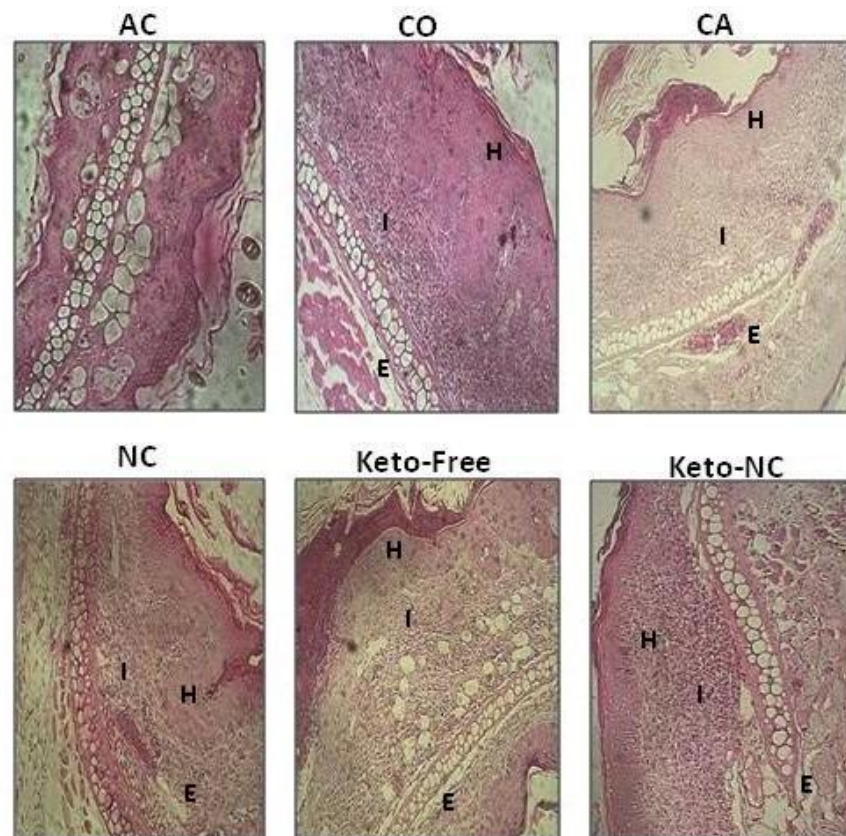


Figure 7

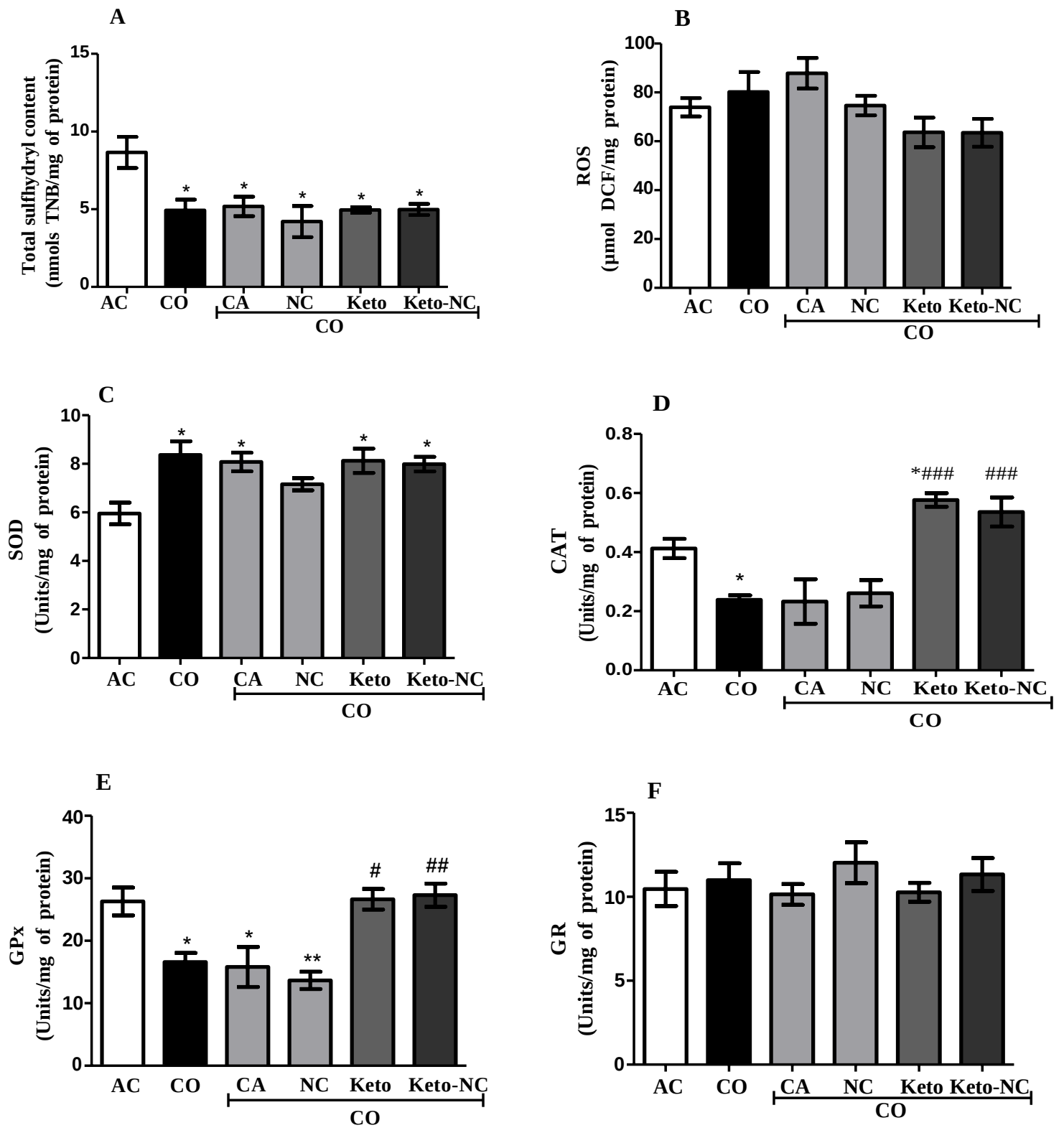


Figure 8

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho com modelo de experimentação animal de inflamação crônica mostram que os fármacos nanoencapsulados são mais efetivos em comparação aos fármacos em sua forma livre. No tratamento terapêutico e profilático pode-se verificar as vantagens do nanoencapsulamento do cetoprofeno sobre o cetoprofeno na forma livre, uma vez o tratamento com cetoprofeno livre e cetoprofeno nanoencapsulado foram capazes de diminuir o edema na orelha de camundongos de forma significativa. No entanto, o tratamento com cetoprofeno nanoencapsulado foi mais eficaz em diminuir esse edema a partir do 7º dia do tratamento terapêutico crônico. Além disso, o cetoprofeno nanoencapsulado diminuiu os parâmetros histológicos (edema, infiltrado inflamatório e o tamanho da espessura da epiderme) confirmando o resultado da medição das orelhas dos animais expostos ao tratamento terapêutico crônico. Esses resultados podem ser atribuídos porque o fármaco na forma nanoencapsulada por apresentar tamanho nanométrico pode acumular seletivamente na região inflamada ficando restrito aos sítios de ação no tecido e nas células alvo da inflamação devido ao seu perfil de liberação prolongada.

Não foram encontrados danos gastrointestinais, hepáticos e renais em nenhum dos grupos de tratamento terapêutico crônico. Esse achado pode ser explicado pelas características do polímero utilizado em nosso estudo, um polímero gastrorresistente que permite a liberação do cetoprofeno em uma porção mais distal do estômago, protegendo a mucosa e reduzindo os efeitos adversos causados pelo contato direto deste com o estômago, indicando assim que o tratamento com nanocápsulas baseadas neste polímero proporciona segurança.

Além disso, foi observado que o óleo de cróton alterou os parâmetros de estresse oxidativo no plasma e eritrócitos de camundongos. Uma possível explicação para este achado é que durante o processo inflamatório induzido por este óleo ocorre o recrutamento principalmente de neutrófilos, monócitos e linfócitos no local da lesão envolvidos na produção de ROS. Entretanto, os tratamentos dos camundongos expostos ao protocolo terapêutico crônico, não causaram mudanças na produção de ROS e no índice total do sulfidrilas, mas produziram mudanças nos parâmetros enzimáticos (SOD, CAT e GPx). O cetoprofeno pode interferir com os parâmetros antioxidantes que estão provavelmente envolvidos no controle da

inflamação, mas o cetoprofeno nanoencapsulado não melhorou esses efeitos, sugerindo que os benefícios da redução do edema quando na forma nanoencapsulada estão associados a outros mecanismos de ação que não são pela via antioxidante.

No entanto, com o protocolo agudo, não houve diferença significativa dos animais tratados com cetoprofeno livre e nanoencapsulado, pois ambos tiveram respostas equivalentes em reduzir o edema. Acreditamos que o protocolo utilizado não foi adequado para avaliar as vantagens do cetoprofeno em nanocápsulas por duas razões: i) o cetoprofeno em nanocápsulas apresenta uma liberação mais lenta e prolongada, fenômeno que dificilmente pode ser observado em poucas horas após a aplicação, nesse caso as análises foram realizadas 6 h após a indução do edema e administração do fármaco; ii) o cetoprofeno em nanocápsulas foi aplicado em dose única.

Com o tratamento profilático pode-se verificar ainda mais as vantagens do nanoencapsulamento do cetoprofeno sobre o cetoprofeno na forma livre, uma vez que o cetoprofeno nanoencapsulado foi capaz de inibir o edema de forma significativa. Estes resultados indicam as vantagens potenciais da utilização de cetoprofeno em nanocápsulas para a prevenção de patologias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide e a doença de Crohn, pois são disfunções que não têm cura e que afetam a qualidade de vida dos pacientes.

De acordo com o resultado apresentado pela curva de dose resposta, o cetoprofeno nanoencapsulado revelou que uma dose 50% mais baixa do que a terapêutica considerada para camundongos foi eficiente na redução significativa do edema induzido pelo óleo de cróton. Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que a principal vantagem das nanocápsulas sobre os fármacos convencionais é a possibilidade de melhorar a liberação seletiva de fármacos para o local de ação, independentemente da via de administração, demonstrando assim que a nanoencapsulação melhora a eficácia e a biodisponibilidade do fármaco proporcionando uma liberação mais prolongada do fármaco para o local inflamado.

Os resultados demonstrados neste trabalho indicam o potencial terapêutico do cetoprofeno nanoencapsulado com o objetivo de apresentar aos pacientes com doenças crônicas medicamentos com menores efeitos adversos e que possam ser administrados em doses menores. Além disso, possivelmente aliado a uma

segurança gastrointestinal melhorada devido o perfil de liberação prolongada sem perder o potencial anti-inflamatório.

Referências

- AL-SAEED, A. Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Oman Medical Journal*, v. 26, n. 6, p. 385-391, 2011.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. e DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro Vasculares e Renais. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BERNARDI, A. ; ZILBERSTEIN, ACCV.; JAGER, E.; CAMPOS, M.M.; MORRONE, F.B.; CALIXTO, J.B. ; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. ; BATTASTINI, A.M.O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, p. 1104-1111, 2009.
- BISHT, K., WAGNER, K.H., BULMER, A.C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as antiinflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, v. 278, n.1, p. 88-100, 2010.
- BISWAS, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2016, p. 1-9, 2016.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 2.
- CORADINI, K.; FRIEDRICH, B. R.; FONSECA, N. F.; VENCATO, S. M.; ANDRADE, D. F.; OLIVEIRA, M. C.; BATTISTEL, P.A.; GUTERRES, S.S.; ROCHA, I.M.; POHLMANN, R. A.; BECK, R. C.R. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin coencapsulated in lipid-core nanocapsules: in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, p. 163-170, 2015.
- COSTA, D.; MOUTINHO, L.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Antioxidant Activity and Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst Mediated by

Arylpropionic Acid Non-steroidal Antiinflammatory Drugs.

Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 29, n. 8, p. 1659-1970, 2006.

COTRAN, R. S, KUMAR, V., COLLINS, T. Patologia Estrutural e Funcional. 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonoids: Potential Therapeutic Agents for the Inflammatory Process. Revista Virtual Química, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

ENSIGN, CONE, HANES. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 557-570, 2012.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FESSI, H; PUISIEUX F.; DEVISSAGUET, J. PH.; AMMOURY, N.; BENITA. S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. International Journal of Pharmaceutics, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastrophyty. Clinical Review: digest liver disease, v. 33, p. 35-43, 2001.

FRANK, L.A.; CONTRI, R. V.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 7, p. 609-735, 2015.

FRIEDRICH, R. B.; CORADINI, K.; FONSECA, F.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R. Lipid-Core Nanocapsules Improved Antiedematogenic Activity of Tacrolimus in Adjuvant-Induced Arthritis Model. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 16, p.1265-1274, 2016.

FRODER, J.G.; DUPEYRÓN, D.; CARVALHO, J.C.T.; MAISTRO, E.L. In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit® L 100 nanocapsules. Genetics and Molecular Research, 2016.

GABOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. Inflammation Protocols, v. 225, p.129-131, 2008.

GENARI, B. et al. Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin. Clinical Oral Investigations, 2016.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Ed. 11 Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GODIC, A.; POLJSK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, n. 1, p. 1-6, 2014.

GOLVEIA, V. M.; LIMA, S.A.C.; NUNES, C.; REIS, S. Non-Biologic Nanodelivery Therapies for Rheumatoid Arthritis. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 11, p. 1701-1721, 2015.

GUERRERO, C.A.; ACOSTA, O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. World Journal of Virology, v. 5, n. 2, p. 38-62, 2016.

HOAI, N. T.; DAO, P.T.T.; PHU, Q. N.; LE, D.D.; NGUYEN, T.A.; NGUYEN, T.C.; DANG, M.C. Ketoprofen encapsulated cucurbit[6]uril nanoparticles: a new exploration of macrocycles for drug delivery. Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology, v. 3, 2012.

KHAYRULLINA, V. R.; TAIPOV I.A.; VESELOVSKY, A.V.; SHCHERBININ, D.S.; GERCHIKOV, A.Y. New Inhibitors of 5-Lipoxygenase Catalytic Activity Based on 2-(3-Methylphenyl)propanoic Acid and 4-Substituted Morpholine Derivatives. Biochemistry, v. 79, n. 4, 2014.

KHERADMANDNIA, S., VASHEGHANI-FARAHANI, E., ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

KUMMER, C.; COELHO, T. C. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, n. 4, 2002.

LAEV, S.S., SALAKHUTDINOV, N.F. Anti-arthritic agents: Progress and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 13, p. 3059-3080, 2015.

MEEK, I.L.; VAN DE LAAR. M. A.F.J.; VONKEMAN. E. H. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. *Pharmaceuticals*, v. 3, n. 7, p.2146-2162, 2010.

MIZUSHIMA, T. Molecular mechanism for various pharmacological activities of NSAIDS. *Pharmaceuticals*, v. 3, p. 1614-1636, 2010.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113 -142, 2010.

MULEY, M.M.; KRUSTEV, E.; MCDOUGALL, J.J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 22, p. 88-101, 2016.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunologia de Janeway*, 7ª ed., Artmed: São Paulo, 2010.

Pelligand, L.; King, J.N.; Hormazabal, V.,Toutain, P.L., Elliott, J.; Lees, P. Differential pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of robenacoxib and ketoprofen in a feline model of inflammation. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 37, n. 4, p. 354-66, 2014. PHAM, C. T. N. Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 3, n.6, p. 607-619, 2011.

PIRES, P. A. Potencial Analgésico, Anti-edematogênico, Antipirético e Atividade Ulcerogênica de Fármacos Anti-inflamatórios em Roedores. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.*

PISOSCHI, A.M. e POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, v. 5, p. 55-74, 2015.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, n.1, p. 1-11, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Trad. Do Nascimento, A. P.); *Farmacologia*, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

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.

SHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, v.16, n. 13, 2005.

SILVEIRA, E.F.; CHASSOT J.M.; TEIXEIRA, F.C.; AZAMBUJA, J.H.; DEBOM, G.; BEIRA, F.T.; DEL PINO, F.A.; LOURENÇO, A.; HORN, A.P.; CRUZ, L.; SPANEVELLO, R.M.; BRAGANHOL E. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *Jornal Investigational New Drugs*, v. 31, n.6, p. 1424-1435, 2013.

SMOLEN, J.S., ALETAHA, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 11, n. 5, p. 276-289, 2015.

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

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 24, n.2, 2003.

TARTAU, L.; CAZACU, A., MELNIG, V. Ketoprofen-liposomes formulation for clinical therapy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, p. 2499-2507, 2012.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Oncology/Hematology*, v. 56, p. 23-46, 2005.

ULBRICH W.; LAMPRECHT A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 7, p. 55-66, 2010.

VAN, A. Anti-inflammatory drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v.16, p. 900-904, 1974.

ZHANG, M.; VIENNOIS, E.; PRASAD, M.; ZHANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, Z.; KWON HAN, M.; XIAO, B.; XU, C.; SRINIVASAN, S.; MERLIN, D. Edible Ginger-Derived Nanoparticles: A Novel Therapeutic Approach for the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer. *Biomaterials*, v. 101, p. 321-340, 2016.

Anexos

Anexo A: Carta de parecer do Cômite de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 16 de maio de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade anti-inflamatória de nanocápsulas de cetoprofeno em um modelo experimental de edema de orelha**", registrada com o nº23110.003588/2016-87, sob a responsabilidade de **Rosélia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 09/05/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/06/2016 a 15/06/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6
Nº de animais	180
Idade	8-10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPEL

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEE A 3588-2016**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: 24/05/2016
Assinatura do Professor Responsável: