

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CINTIA OLIVEIRA ALVES

**FASES LAMELARES ASSOCIADAS A LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS E
METOTREXATO PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE**

**Alfenas/MG
2019**

CINTIA OLIVEIRA ALVES

**FASES LAMELARES ASSOCIADAS A LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS E
METOTREXATO PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Flávia Chiva Carvalho
Coorientadora: Professora Dra. Livia Maria Rosatto Moda

**Alfenas/MG
2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação(CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Alfenas

A474f

Alves, Cintia Oliveira.

Fases lamelares associadas a lipídeos fisiológicos e metotrexato para tratamento tópico da psoríase / Cintia Oliveira Alves. -- Alfenas/MG, 2019. 131 f.: il. --

Orientadora: Flávia Chiva Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Administração tópica. 2. Cristal líquido. 3. Lipídeos. 4. Metotrexato. 5. Psoríase. I. Carvalho, Flávia Chiva. II. Título.

CDD-615

CINTIA OLIVEIRA ALVES

“FASES LAMELARES ASSOCIADAS A LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS E METOTREXATO PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 22/02/2019

Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Dra. Marcia Helena Oyafuso
Instituição: Empresa Theraskin

Assinatura:



Profa. Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer que existiram momentos em que foi preciso alguém, um ombro e uma palavra amiga, um olhar, um amor...

Agradeço primeiramente a Deus, por sua presença terna e amorosa, por ter iluminado meu caminho e me presenteado com saúde, determinação, força, serenidade interior e pessoas especiais em minha vida. Apesar de eu nada ser me permitiu tornar-me quem sou...

À minha querida mãe Márcia, que me amou mesmo antes de eu nascer. Por ter me criado, educado, transmitido valores que julgo essenciais para todo ser humano, acompanhado meu crescimento, pela grandiosidade dos sonhos que sonhou por mim, por ter acreditado e rezado por mim, pelas madrugadas que esperou carona comigo, por toda preocupação e carinho. Por ter me ensinado a ter fé em Deus principalmente nas horas difíceis. Essa fé me ajudou a chegar até aqui!! Sou eternamente grata e amo a senhora!!!

À minha mais que irmã Letícia, companheira de todas as horas, minha “orientadora” durante este trabalho, mesmo estando também nessa difícil jornada. Você, com sua sensibilidade, percebeu minhas necessidades ao contrário de muitos e me ouviu, acalmou, aconselhou, ajudou com a “mão na massa”, me deu carinho e atenção. Entre risadas, conversas e também raras discussões, sabemos que podemos contar uma com a outra. Mais uma vez muito obrigada! Amo você!!!!

Agradeço também à minha orientadora Flávia, por ter me acolhido de braços abertos, logo eu uma aluna tão perdida em tudo referente a esse novo mundo acadêmico. Obrigada por ter me despertado a paixão por cristais líquidos e pela pele, acredito que não poderia ter escolhido melhor tema para estudar!!! Agradeço por ter me ajudado a superar tantos desafios com mais facilidade, por tanta atenção e dedicação a mim prestados, pelas horas de almoço oferecidos à minha orientação. Sua trajetória profissional é uma inspiração para mim!!!

Quero agradecer à minha coorientadora Livia, por ter me ajudado nos experimentos do confocal, por termos aprendido tantas coisas juntas e por cada minuto a mim dedicado!

Agradeço também à secretária Fabiana, às técnicas Andrea e Neila e a todas minhas amigas do Laboratório de Pesquisa de em Sistema de Liberação de Fármacos. Vocês foram fundamentais nessa minha trajetória.

Agradeço à professora Gislaine, por participado em tantos momentos dessa minha caminhada, por ter sido professora de uma disciplina da qual participei, por todo o suporte enquanto a minha orientadora estava fora, por ter participado da minha banca de qualificação e defesa, enfim, por todo seu carinho e atenção. Você é uma inspiração para mim! Você, com certeza, me moldou como profissional!

Agradeço à Marcia Oyafuso pela participação em minha banca de defesa. Todas as suas considerações e conselhos foram muito preciosos para mim. Foi um prazer ter a autora de muitos trabalhos que li como membro da banca!

Quero agradecer às minhas amigas de mestrado Tamires, Isabelly e Isabel e também às minhas amigas de orientação Maria Tereza, Sandra e Valéria, que de diversas maneiras me ajudaram e, sem dúvida alguma, me ajudaram a passar por de forma mais leve e agradável diversos momentos!!! À cada uma, de maneira singular, minha eterna gratidão por todo carinho e amizade!!!!

Agradeço aos meus amigos particulares Alice, Alysson, Dundee e Jéssica, pela conexão absurda que tenho com cada um de vocês!!! Cada um me ajudou a seu modo, com risadas, um ombro amigo, uma palavra, frasquinhos rrsrrsrs, com orações, conselhos, enfim, o que fosse necessário no momento!! Apesar de não saberem o quanto, vocês são muito importantes em minha vida!!!!

Agradeço ao apoio da Capes pela concessão da bolsa.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

A psoríase, doença caracterizada por diferenciação epidérmica deficiente, é tratada usualmente com metotrexato, um medicamento eficaz, mas associado à grave toxicidade sistêmica. Apesar de a administração tópica ser uma alternativa, essa muitas vezes se mostra ineficiente devido à sua restrita penetração cutânea. Cristais líquidos, se apresentam como um veículo apropriado, pois quando organizados de modo semelhante à matriz lipídica córnea podem aumentar a penetração cutânea de fármacos e a hidratação cutânea. Esses resultados são ainda mais promissores quando são usados lipídeos fisiológicos, os quais podem facilitar o reparo da barreira cutânea prejudicada. O objetivo do trabalho foi desenvolver fases lamelares contendo lipídeos fisiológicos e metotrexato para potencial tratamento tópico da psoríase. O comportamento de fases foi investigado pela construção de diagramas ternários de fases e associações combinando diferentes tensoativos: polioxietileno 2 cetil éter (OLETH-2), polioxietileno 10 cetil éter (CETETH-10), álcool cetílico 20 etoxilado e 5 propoxilado (PPG-5CETETH-20) ou etilenodiamina tetrakis (propoxilado etoxilado) tetrol (T 701), dietilenoglicol monoetil éter, como cotensoativo (CoT), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO), colesterol (CHO) e ceramida 3 (CER), como lipídeos fisiológicos e água. Amostras foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada, análise de textura, bioadesão, reologia e efeito promotor através de estudos de penetração cutânea *in vitro*. Com um extenso estudo de comportamento de fase combinando um grande número de proporções entre tensoativos, cotensoativo, fases oleosas e água observou-se fases lamelares contendo CHO, CER, CHO e CER ou CoT. Foi possível a incorporação de metotrexato a 1% em todas as fases lamelares, as quais possuíam pH compatível com a via cutânea. O ensaio de perfil de textura revelou que as fases lamelares eram compressíveis, adesivas e coesas, adequadas, portanto, para a aplicação na pele. Os valores de trabalho de bioadesão das fases lamelares, em geral, foram superiores aos de géis de carbopol, tradicionalmente bioadesivos. A análise reológica oscilatória confirmou o comportamento elástico, característico de gel, para todas as fases lamelares. A avaliação do efeito promotor dos cristais líquidos demonstrou que C4CHOCER foi mais eficiente em promover a retenção cutânea de substâncias hidrofílicas em comparação com emulsão convencional com os mesmos componentes ou mesofase lamelar C4CHO, a qual não possuía CER. Portanto, o desenvolvimento de fases lamelares propostas têm potencialidade para se tornarem veículos para aumentar a retenção cutânea de substâncias hidrofílicas, como o metotrexato. Além disso, o próprio veículo pode vir a ser uma excelente forma de tratamento para distúrbios cutâneos relacionados com secura, desidratação e queratinização anormal do estrato córneo, como a psoríase, pela presença de lipídeos fisiológicos.

Palavras-chave: Administração tópica. Cristal líquido lamelar. Lipídeos fisiológicos. Metotrexato. Psoríase.

ABSTRACT

Psoriasis, a disease characterized by deficient epidermal differentiation, is usually treated with methotrexate, an effective drug, but associated with severe systemic toxicity. Although topical administration is an alternative, it often proves to be inefficient because of its limited cutaneous penetration. Liquid crystals are presented as an appropriate vehicle because when organized similarly to the corneal lipid matrix they may increase cutaneous penetration of drugs and cutaneous hydration. These results are even more promising when physiological lipids are used, which may facilitate repair of the impaired skin barrier. The objective of this work was to develop lamellar phases containing physiological lipids and methotrexate for potential topical treatment of psoriasis. The behavior of phases was investigated by the construction of ternary phase diagrams and combinations combining different surfactants: polyoxyethylene 2-cetyl ether (OLETH-2), polyoxyethylene 10-cetyl ether (CETETH-10), 20-ethoxylated and 5-propoxylated cetyl alcohol (PPG-5-CETETH-20) or ethylenediamine tetrakis (ethoxylated propoxylated) tetrol (T 701), diethyleneglycol monoethyl ether, as cosurfactant (CoS), stearic acid (SA), oleic acid (OA), cholesterol (CHO) and ceramide 3 (CER), such as physiological lipids and water. Samples were characterized by polarized light microscopy, texture analysis, bioadhesion, rheology and promoting effect through *in vitro* cutaneous penetration studies. With an extensive study of phase behavior combining a large number of proportions between surfactants, cosurfactant, oily phases and water it was possible to obtain lamellar phases lamellar phases containing CHO, CER, CHO and CER or CoS. It was possible to incorporate 1% methotrexate in all the lamellar phases, which had pH compatible with the cutaneous route. The texture profile assay revealed that the lamellar phases were compressible, adhesive and cohesive, therefore suitable for application to the skin. The bioadhesion work values of the lamellar phases, in general, were higher than those of carbopol gels, traditionally bioadhesive. The oscillatory rheological analysis confirmed the elastic behavior, characteristic of gel, for all the lamellar phases. The evaluation of the promoter effect of liquid crystals showed that C4CHOCER was more efficient in promoting cutaneous retention of hydrophilic substances compared to conventional emulsion with the same components or C4CHO lamellar mesophase, which did not have CER. Therefore, the development of proposed lamellar phases have the potential to become vehicles to increase cutaneous retention of hydrophilic substances such as methotrexate. Besides that, the vehicle itself may prove to be an excellent form of treatment for cutaneous disorders related to dryness, dehydration and abnormal keratinization of the stratum corneum, such as psoriasis, by the presence of physiological lipids.

Keywords: Topical administration. Lamellar liquid crystal. Physiological lipids. Methotrexate. Psoriasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das camadas cutâneas, destacando a epiderme e o padrão “bricks and mortar”.....	18
Figura 2 - Placa única de psoríase, bem demarcada e bastante escamosa.	21
Figura 3 - Comparação histológica entre pele normal e pele psoriática.	22
Figura 4 - Esquema representativo da evolução imunoinflamatória característica da psoríase.	24
Figura 5 - Comparação das estruturas químicas do ácido fólico e do metotrexato.	26
Figura 6 - Ionização da molécula de metotrexato.....	27
Figura 7 - O parâmetro de empacotamento crítico (PEC) relaciona a área da cabeça polar, o tamanho da cadeia e o volume da cadeia hidrofóbica.	40
Figura 8 - Parâmetros de empacotamento crítico (PEC) de moléculas de tensoativo e estruturas auto-organizadas preferencialmente formadas.	41
Figura 9 - Diferença entre os prováveis efeitos da aplicação cutânea de lipídeos não fisiológicos e.....	45
Figura 10 - Rotas para a penetração cutânea de fármacos.	49
Figura 11 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de OLETH-2, ácido esteárico e água.....	61
Figura 12 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas B1 e B2.	62
Figura 13 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de CETETH-10, ácido esteárico e água.....	63
Figura 14 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C2, C3, C4 e C5.....	64
Figura 15 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido esteárico e água.	65
Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas P, P2, P3 e P4.	66
Figura 17 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de T 701, ácido esteárico e água.	67
Figura 18 - Configuração molecular simplificada da molécula de Tetronic®.....	68

Figura 19 -	Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas T1a, T2, T3 e T4.....	69
Figura 20 -	Estrutura molecular dos tensoativos OLETH-2, CETETH-10, PPG-5-CETETH-20 e T 701 e da fase oleosa ácido esteárico.	71
Figura 21 -	Estrutura molecular do ácido esteárico e do ácido oleico (cis) (A) e diferença entre	72
Figura 22 -	Estrutura molecular do cotensoativo dietilenoglicol monoetil éter.	75
Figura 23 -	Estrutura molecular do colesterol.....	78
Figura 24 -	Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C4 e C4CHO.	80
Figura 25 -	Estrutura molecular da ceramida 3.	82
Figura 26 -	Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C4CHO, C4CHOCER, P e PCER.....	84
Figura 27 -	Gráficos das medidas realizadas através da análise do perfil de textura - TPA quanto à compressibilidade, coesão e adesividade.	88
Figura 28 -	Gráfico da medida realizada através da avaliação in vitro da bioadesão, através da qual obteve-se o trabalho de bioadesão.....	92
Figura 29 -	Reogramas obtidos com as medidas de reologia oscilatória dos sistemas C4CHO, C4CHOCER, P e PCER demonstrando a variação do módulo de armazenamento G' (símbolos cheios) e do módulo de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência.....	95
Figura 30 -	Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser representando a fluorescência do marcador hidrofílico fluorescente sulforodamina B no estrato córneo, epiderme viável e derme superior determinada a cada tempo pré-estabelecido após a aplicação de controle: 1 h (A), 6 h (B) e 12 h (C), fase lamelar C4CHO: 1 h (D), 6 h (E) e 12 h (F) e fase lamelar C4CHOCER: 1 h (G), 6 h (H) e 12 h (I). Barra de escala: 20 μ m.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.....	32
Tabela 2 - Efeito da substituição parcial da fase oleosa composta por ácido esteárico por ácido oleico nos sistemas C4, P e T2.	73
Tabela 3 - Efeito da associação do dietilenoglicol monoetil éter (CoT) aos sistemas C4, P e T2, compostas por ácido esteárico como fase oleosa.....	76
Tabela 4 - Efeito da adição de colesterol à fase oleosa composta por ácido esteárico aos sistemas C4, P e T2.	79
Tabela 5 - Efeito da adição de ceramida 3 à fase oleosa composta por ácido esteárico e colesterol aos sistemas C4CHO, P e T2.	82
Tabela 6 - Valores do potencial hidrogeniônico (pH) dos sistemas selecionados incorporados com metotrexato.....	86
Tabela 7 - Valores médios e desvios padrões dos parâmetros compressibilidade, adesividade e coesão obtidos para os sistemas selecionados.....	87
Tabela 8 - Valores da regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para os sistemas estudados.....	97
Tabela 9 - Nomenclatura e composição (%p/p) das fases lamelares e controle usados no estudo de avaliação do efeito promotor <i>in vitro</i>	99

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AE	- cido esteárico
AO	- cido oleico
CER	- Ceramida 3
CETETH-10	- Polioxietileno 2 cetil ter
CHO	- Colesterol
CoT	- Dietilenoglicol monoetil ter
EC	- Estrato córneo
EHL	- Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FDA	- do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
G'	- Módulo elástico
G''	- Módulo viscoso
IL	- Interleucina
IFN-	- Interferon-gama
LF	- Lipídeos fisiológicos
MCVL	- Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MLP	- Microscopia de luz polarizada
MTX	- Metotrexato
OLETH-2	- Polioxietileno 2 cetil ter
PASI	- do inglês <i>Psoriasis Area and Severity Index</i> , ndice de Gravidade da área de Psoríase
PEC	- Parâmetro de empacotamento crítico
PPG-5-CETETH-20	- lcool cetílico 20 etoxilado e 5 propoxilado
SF	- Separação de fases
SO	- Sistemas opacos
STAV	- Sistemas transparentes altamente viscosos
STV	- Sistemas transparentes viscosos
T 701	- Etilenodiamina tetrakis (propoxilado etoxilado) tetrol
TEWL	- do inglês <i>Transdermal water loss</i> , Perda transpidérmica de gua
TPA	- do inglês <i>Texture Profile Analysis</i> , Análise do perfil de textura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	PELE	17
2.2	PSORÍASE	20
2.3	METOTREXATO	26
2.4	FORMULAÇÕES TÓPICAS COM METOTREXATO PARA O TRATAMENTO DA PSORÍASE	31
2.5	SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS	38
2.6	LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS COMO EMOLIENTES CUTÂNEOS.....	43
2.7	PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS.....	48
3	OBJETIVOS	51
3.2	OBJETIVO GERAL.....	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	MATERIAIS	52
4.1.1	Matérias-primas, reagentes e solventes	52
4.1.2	Equipamentos.....	52
4.2	MÉTODOS	53
4.2.1	Construção dos diagramas de fases	53
4.2.2	Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP).....	54
4.2.3	Avaliação do comportamento de fases com associação de ácido oleico	54
4.2.4	Avaliação do comportamento de fases com associação de dietilenoglicol monoetil éter	55
4.2.5	Avaliação do comportamento de fases com associação de colesterol.....	55
4.2.6	Avaliação do comportamento de fases com associação de ceramida 3	56
4.2.7	Teste de incorporação do metotrexato e determinação de pH dos sistemas.....	56
4.2.8	Análise do perfil de textura – TPA	57
4.2.9	Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva	57
4.2.10	Análise reológica oscilatória	58
4.2.11	Avaliação do efeito promotor <i>in vitro</i> de mesofases lamelares associadas a lipídeos fisiológicos	59

4.2.12	Análise estatística	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS TERNÁRIOS DE FASES	61
5.2	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO OLEICO.....	72
5.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE COTENSOATIVO DIETILENOGLICOL MONOETIL ÉTER	75
5.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE COLESTEROL.....	78
5.5	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE CERAMIDA 3.....	81
5.6	TESTE DE INCORPORAÇÃO DO METOTREXATO E DETERMINAÇÃO DE PH DOS SISTEMAS.....	85
5.7	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA – TPA	86
5.8	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA FORÇA BIOADESIVA.....	91
5.9	ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA	94
5.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO PROMOTOR <i>IN VITRO</i> DE MESOFASES LAMELARES ASSOCIADAS A LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS	98
6	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença comum da pele mediada pelo sistema imune, crônica e inflamatória que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, associada a uma importante redução na qualidade de vida do paciente (NOGRALES et al., 2008; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; ARMSTRONG et al., 2012). Histopatologicamente, ocorrem alterações características em quase todos os tipos de células cutâneas, acantose epidermal devido à hiperproliferação e diferenciação incompleta dos queratinócitos, neovascularização, angiogênese, migração de neutrófilos e infiltrado de células inflamatórias na derme e epiderme (BRAVERMAN; YEN, 1977; WAGNER et al., 2010; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Caracteriza-se, clinicamente, por lesões secas bem demarcadas, de cor vermelho-brilhante com placas espessas branco-prateadas em várias camadas que acometem, geralmente, o couro cabeludo, joelhos e cotovelos (GUTTMAN-YASSKY; NOGRALES; KRUEGER, 2011).

A secura e a inflamação, aspectos clínicos característicos nessa doença cutânea, estão associados com o comprometimento da função de barreira exercida pelo estrato córneo (EC), o qual relaciona-se com o aumento da perda transpidérmica de água (TEWL), redução nos níveis de hidratação e redução de lipídeos da superfície da pele, sobretudo níveis de ceramidas (MOTTA et al., 1994a; LODÉN, 2003; LEBWOHL; HERRMANN, 2005; YE et al., 2014). Sendo assim, os emolientes são essenciais no tratamento de formas intermediárias e de remissão da psoríase devido à sua propriedade de reidratar o EC, reparar a função de barreira da pele, melhorar seu aspecto sensorial e tratar a pele seca e escamosa (WITMAN, 2001; LODÉN, 2003; FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008; PROKSCH, 2008; SEITE et al., 2009; LAKSHMI; BHASKRAN, 2011; LODÉN, 2012). Dentre os emolientes, destacam-se os lipídeos fisiológicos (LF), representados pelas três principais classes de lipídeos do EC, ou seja, ácidos graxos, colesterol e ceramidas, os quais apresentam, além do efeito oclusivo, a capacidade de penetrarem o EC, preencherem os espaços intercelulares e fornecer lipídeos para as células da epiderme permitindo a normalização da síntese e secreção lipídica, necessárias para a restauração da pele enquanto barreira (MAO-QIANG; ELIAS; FEINGOLD, 1993; MAO-QIANG; BROWN; WU-PONG, 1995).

No que se refere ao tratamento farmacológico, o metotrexato (MTX) é tido como fármaco de escolha para o tratamento de casos moderados e severos de psoríase vulgar. Tem sido demonstrado que esse fármaco é efetivo por inibir a proliferação de células epidermais e possuir efeito imunomodulador e anti-inflamatório. Apesar da inquestionável eficiência clínica do MTX, sua administração por via oral ou parenteral está associada à uma série de efeitos adversos graves, dentre os quais destaca-se a hepatotoxicidade (ZANOLLI; SHERERTZ; HEDBERG, 1990; OLSEN, 1991; HAUSTEIN; RYTTER, 2000; TORRES-ÁVAREZ et al., 2007; BARKER et al., 2011; MONTAUDIÉ et al., 2011).

Nesse sentido, a administração tópica do MTX tem sido proposta para reduzir a ocorrência desses efeitos (TROTТА et al., 2004). Entretanto, o grande problema da terapia tópica com MTX são suas características físico-químicas, como hidrossolubilidade, peso molecular e estado dissociado em pH fisiológico, as quais limitam sua difusão através do EC (ALVAREZ-RUEDA et al., 2007; DUBEY et al., 2008; SANTOS et al., 2017).

Na tentativa de promover um aumento da penetração do MTX na pele, técnicas como iontoforese (PRASAD et al., 2009) e eletroporação (LEE et al., 2008), ou veículos nanoestruturados como microemulsões (AMARIJI et al., 2016), nanogeis (PANONNUMMAL; SABITHA, 2018), lipossomas deformáveis (ZEB et al., 2016) e nanopartículas lipídicas sólidas (FERREIRA et al., 2017) têm sido explorados. No entanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos sistemas que possam ser aplicados para que o MTX possa superar a barreira exercida pelo EC já que ainda não há disponível comercialmente uma formulação tópica efetiva com esse fármaco (AMARIJI et al., 2016; PANONNUMMAL; SABITHA, 2018).

Em comparação com outros sistemas de liberação tópica, o uso de cristais líquidos tem apresentado diversas vantagens tais como a possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos e promotores de penetração/permeação, consistência adequada para aplicação tópica, facilidade de preparação e produção em escala, estabilidade termodinâmica e formação espontânea (BOYD et al., 2006; LOPES et al., 2006; SAGALOWICZ et al., 2006; DUNCKE et al., 2016).

Sistemas líquido cristalinos são estruturas nanométricas com estrutura bi ou tridimensional, com características hidrofílicas e lipofílicas, organizados em fases que podem variar entre cúbica, hexagonal e lamelar. A fase cúbica é formada por duas

redes de canais de solvente dispostos em uma estrutura tridimensional altamente organizada. A mesofase hexagonal é formada por tensoativo e água dispostos em cilindros os quais formam uma estrutura bidimensional. A fase lamelar é constituída de uma estrutura unidimensional formada por bicamadas paralelas e planas compostas por tensoativo e separadas por uma camada de água (TIDDY, 1980; HYDE, 2001).

Em especial, as fases lamelares são veículos recomendados para aplicação dérmica por exibirem propriedades reológicas e consistência adequadas (MAKAI et al., 2003; LOPES et al., 2006; GARCIA et al., 2018). A estrutura singular das fases lamelares é semelhante à membrana lipídica intercelular cutânea e, por isso, tem a capacidade de aumentar a retenção de fármacos na pele, reduzir os níveis de perda transpidérmica de água, e conseqüentemente melhorar a hidratação da pele em comparação com emulsões convencionais (VYAS; JAITELY; KANAUIA, 1997; IWAI; FUKASAWA; SUZUKI, 1998; NESSEEM, 2001; BENDER et al., 2005; SAVIC et al., 2011, LEE et al., 2015).

Portanto, considerando as alterações histológicas próprias da psoríase, as características físico-químicas do MTX que limitam sua retenção nas camadas viáveis da pele e em vista da potencialidade dos cristais líquidos, o objetivo deste trabalho é combinar lipídeos cutâneos em sistemas líquidos lamelares incorporados com MTX como estratégia para o tratamento tópico da psoríase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele constitui um órgão heterogêneo e complexo de revestimento do corpo humano, com área superficial de aproximadamente 1,7 m², o que corresponde a cerca de 5,5% da massa corporal, e, por isso, muitas vezes é considerada um dos maiores órgãos do corpo humano (GOLDSMITH, 1990).

Trata-se de um órgão multifuncional que tem como função principal a manutenção do equilíbrio fisiológico, protegendo os órgãos internos de traumas mecânicos e radiação ultravioleta e também evitando a desidratação excessiva. Desempenha ainda importante papel na sensibilidade tátil, dolorosa e sensação de prurido, termoregulação, síntese de hormônios e vitaminas e participação na resposta imune na defesa contra microrganismos, espécies reativas de oxigênio e diversos xenobóticos (WALL, 1960; WILSON; WALKER, 1969; MATHIAS; WILSON; MAIBACH, 1981; MACLAUGHLIN; HOLLICK, 1985; EDWARDS; MARKS, 1995; SHIBASAKI; WILSON; CRANDALL, 2006).

Basicamente, a pele é composta por quatro camadas: o EC (epiderme não viável), as demais camadas da epiderme (epiderme viável), derme e hipoderme. Associadas ao tecido cutâneo, em particular à derme, encontram-se vários apêndices como vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (NIEMANN; WATT, 2002; WALTERS; ROBERTS, 2002; BENSON, 2012).

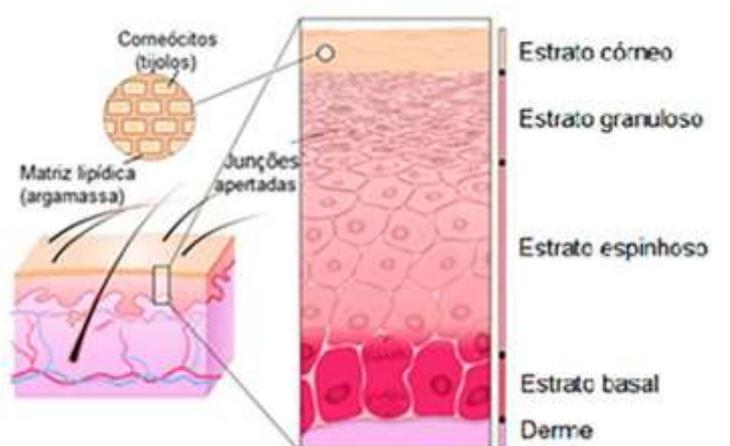
A hipoderme, camada inferior, consiste em células gordurosas ovais-poligonais dispostas como lóbulos organizados em camadas únicas ou múltiplas com septos fibrosos que conectam a derme à *fascia superficialis*. Essa região proporciona isolamento térmico, proteção contra choques físicos, armazenamento de energia e suprimento de vasos e nervos à pele (SARBATIAN et al., 2010; LANCEROTTO et al., 2011; BENSON, 2012).

A derme está localizada entre a hipoderme e a epiderme e compõe-se de fibras colágenas (que conferem resistência à tração, apoio e amortecimento) e fibras elásticas (que conferem elasticidade), em uma matriz de mucopolissacarídeos. Em geral, a derme possui poucas células sendo as mais representativas os fibroblastos, mastócitos e melanócitos. Além de ser um suporte para a epiderme, a derme fornece

nutrientes à pele e desempenha um importante papel na regulação da temperatura e percepção de calor e dor (LOEWI, 1961; FLEISCHMAJER, PERLISH, BASHEY; 1972; DALY, 1982; WALTERS; ROBERTS, 2002).

A epiderme humana é dividida em quatro camadas distintas (Figura 1): o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o EC. O estrato basal é composto por células-tronco epidérmicas e, por células amplificadoras derivadas delas, que passam por uma rápida divisão celular a fim de repor as células perdidas através da diferenciação terminal da superfície. As células possuem alta relação entre núcleo e citoplasma, organelas celulares como mitocôndrias e filamentos de queratina. Outras células que compõe essa camada da epiderme são as células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos. O estrato espinhoso consiste em duas ou seis camadas de queratinócitos que possuem morfologia poligonal, citoplasma aumentado e com muitas organelas, agora também com a presença de corpos lamelares, filamentos de queratina e muitos desmossomos, os quais dão uma aparência espinhosa às células. O estrato granuloso se encontra acima do estrato espinhoso e contém células poligonais com núcleo centralizado com citoplasma repleto de grânulos de queratina (FUCHS, 1990; MENON, 2002; BENSON, 2012).

Figura 1 - Representação esquemática das camadas cutâneas, destacando a epiderme e o padrão "bricks and mortar".



Fonte: Adaptado de SEGRE (2006).

O EC, a principal camada epidérmica no que se refere à funcionalidade, consiste em queratinócitos achatados, agora chamados de corneócitos, que sofreram diferenciação terminal pela degradação do núcleo, perda do DNA e formação de um envelope cornificado único que funciona como plataforma para a matriz extracelular enriquecida com lipídeos (WHITE; MIREJOVSKY; KING, 1988; FISCHER et al., 2007).

Os corneócitos estão organizados em sobrepostas camadas envoltas por uma matriz lipídica assim como uma parede com tijolos (células) e argamassa (matriz lipídica) em um padrão conhecido como “*bricks and mortar*” (Figura 1) (WATT, 1983; FUCHS, 1990; POUMAY; COQUETTE, 2007).

Estudos demonstraram que essa matriz lipídica compõe cerca de 10% da massa do EC e tem uma organização lamelar única composta aproximadamente por 50% de ceramidas, 25% de colesterol e 15% de ácidos graxos, em massa, com pequena porção de fosfolipídeos (GRAY et al., 1982).

No EC humano, 9 classes de ceramidas foram identificadas (ROBSON et al., 1994), as quais se diferenciam pela estrutura do ácido graxo e do aminoálcool. Em misturas preparadas com lipídeos isolados do EC e também no EC humano intacto, diferentes ceramidas demonstram ter um papel crucial para a formação da fase lamelar da matriz lipídica córnea (BOUWSTRA et al., 1998; MOORE; REREK; MENDELSON, 1999). Existem ainda fortes evidências que sugerem que a ligação covalente nas ceramidas também são correlacionadas com a redução de TEWL, por manterem a função de barreira da pele (MEGURO et al., 2000). As ceramidas ainda agem como segundos mensageiros, sendo liberadas pelas células em resposta a estímulos e são capazes de mediar respostas biológicas como, proliferação celular, diferenciação terminal e apoptose (HANNUN, 1994; WAKITA et al., 1994; VERHEIJ et al., 1996).

Dentre os esteróis presentes no EC, o colesterol é o mais abundante, que se encontra sobretudo na forma de sulfato de colesterol. A redução na concentração de sulfato de colesterol está associada ao aumento da descamação, pois essa molécula inibe proteases envolvidas nesse processo. Sugere-se também que o sulfato de colesterol estabiliza a camada lipídica na camada mais profunda do EC mantendo os corneócitos unidos. À redução do sulfato de colesterol tem sido atribuída a indução da cristalização de colesterol e a diminuição da coesão entre as lamelas lipídicas (ELIAS et al., 1984; SATO et al., 1998; BOUWSTRA et al., 1999; ELIAS et al., 2014).

A epiderme humana é formada ainda por ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica e graus de insaturação, dentre os quais encontram-se ácido mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico, ignocérico, araquídico, linoleico, sendo esse o mais abundante. A inibição da síntese de ácidos graxos por um agente externo, diminui a síntese de ácidos graxos na epiderme, favorece a formação de corpos lamelares anormais e atrasa a recuperação da permeabilidade normal da pele.

Esses efeitos são revertidos quando ácidos graxos são fornecidos à pele o que demonstra que os ácidos graxos têm um papel fundamental na homeostase da barreira cutânea (CHAPKIN et al., 1986; MAO-QIANG; ELIAS; FEINGOLD, 1993).

Esses lipídeos formadores do EC são fornecidos por corpos lamelares, estruturas ovais com 0,2-0,3 µm de diâmetro secretadas por células da camada granulosa que fornecem lipídeos polares precursores da matriz lipídica. Após a secreção, esses lipídeos polares são metabolizados no espaço extracelular do EC por enzimas co-secretadas pelos corpos lamelares (ELIAS et al., 2006).

Com relação à organização, observações *in vivo* realizadas por Breathnach et al. (1973) evidenciaram que esses lipídeos estavam organizados em arranjos multilamelares e, também confirmado em experimentos que reproduziram camadas lipídicas do EC (GROEN et al., 2008). Posteriormente, propôs-se que existem duas fases lamelares lipídicas, de curta ou longa periodicidade, e uma fase líquida descontínua central, o que originou o modelo “sanduíche” (BOUWSTRA et al., 2000).

A fim de manter a integridade, flexibilidade e atividade catabólica crítica da pele é necessário que o EC esteja sempre hidratado. A manutenção do balanço hídrico no EC é vital para o tecido e é preservada por três mecanismos principais. O primeiro deles é a presença de lipídeos lamelares, os quais formam uma barreira eficaz à perda excessiva de água através do tecido. O segundo mecanismo se deve aos queratinócitos que desempenham também uma importante função contribuindo para a barreira à água. O último mecanismo é devido ao fator de hidratação natural, presente nas células do EC (ROUGIER, 1988; HARDING; BARTOLONI; RAWLINGS, 2000).

2.2 PSORÍASE

A psoríase é uma patologia cutânea comum e inflamatória, que por seu início precoce e natureza crônica, tem um grande impacto ao longo da vida do paciente e da comunidade no qual está inserido (PATHIRANA et al., 2009). A psoríase é considerada igualmente prevalente em ambos os sexos e acomete pessoas de todas as idades, sendo que, pelo menos 100 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo (PARISI et al., 2013; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; WHO, 2016). No Brasil, estima-se que a prevalência da doença varie entre 1,1 e 1,5% (ROMITI et al., 2017).

A psoríase vulgar, tipo mais comum da doença, representa cerca de 90% dos casos e caracteriza-se por lesões na forma de pápulas escamosas (diâmetro inferior a 1 cm) ou placas (diâmetro superior a 1 cm), bem delineadas e separadas da pele normal circundante. As placas e pápulas possuem coloração vermelhas ou salmão e são cobertas por escamas brancas ou prateadas (Figura 2). Essas placas possuem forma simétrica e ocorrem com maior frequência nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo, região lombosacral e umbilical (LANGLEY; KRUEGER; GRIFFITHS, 2005; GRIFFITHS; BARKER, 2007).

Figura 2 - Placa única de psoríase, bem demarcada e bastante escamosa.

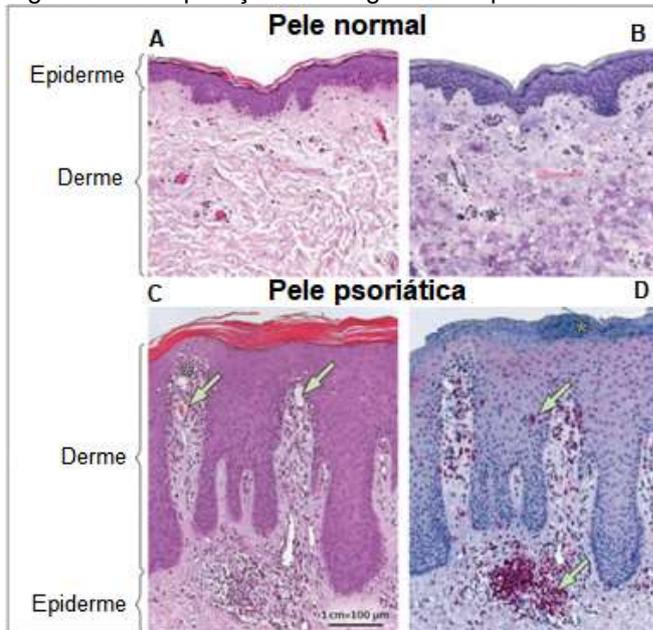


Fonte: Adaptado de GRIFFITHS; BARKER (2007).

Histologicamente (Figura 3), as lesões psoriáticas caracterizam-se pela acantose epidérmica (espessamento das camadas viáveis cutâneas), devido à hiperproliferação e diferenciação alterada de queratinócitos, vasos sanguíneos proeminentes na derme, migração de neutrófilos e infiltração de células inflamatórias na derme e epiderme (GRIFFITHS; BARKER, 2007; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). A pele psoriática geralmente exhibe episódios de queratose (protuberâncias ásperas e levemente vermelhas na pele), hiperacantose (espessamento do EC, fenômeno muitas vezes associado à presença de uma quantidade anormal de queratina e pelo aumento da camada granular), paraqueratose (modo de queratinização associado ao desbaste ou perda da camada granular da epiderme acompanhada da retenção de queratinócitos com núcleo no EC, bastante característica da psoríase) e alguns sinais de ortoqueratose (formação de uma camada de queratina anuclear, característica de epidermes normais). A rápida proliferação dos queratinócitos pode causar a produção de queratinócitos paraqueratóticos na pele psoriática, e, portanto, a formação de um EC mal aderente, o que resulta nas placas características ou flocos da lesão na

psoríase (GUPTA et al., 1990; BRADY, 2004; KRUEGER; BOWCOCK, 2005; ROBERSON; BOWCOCK, 2010).

Figura 3 - Comparação histológica entre pele normal e pele psoriática.



Fonte: Adaptado de BOEHNCKE; SCHÖN (2015).

Características histopatológicas da psoríase: Dentro da placa típica, a epiderme psoriática apresenta acentuada acantose epidérmica, hiperqueratose e alongamento das cristas (A, pele normal e B, pele psoriática lesional corada com hematoxilina e eosina). Vasos sanguíneos dérmicos dilatados e contorcidos alcançam as pontas das papilas dérmicas (B, setas). Um infiltrado inflamatório com neutrófilos se acumula dentro da epiderme (B, asterisco). Em contraste com a pele normal (C), existem muitas células T na derme e na epiderme na lesão da psoríase (D, setas). Núcleos celulares presentes na camada cornificada da epiderme também são característicos da lesão psoriática, ou seja, paraqueratose (D, asterisco).

Apesar de a psoríase ser caracterizada por placas sobrepostas de pele espessa, o EC é funcionalmente deficiente, o que implica em uma função de barreira prejudicada (YA-XIANG; SUETAKE; TAGAMI, 1999). A alteração do EC associada à hiperproliferação de queratinócitos e à inflamação parece também aumentar a penetração de substâncias nas lesões (LIN et al., 2010; PROW et al., 2011).

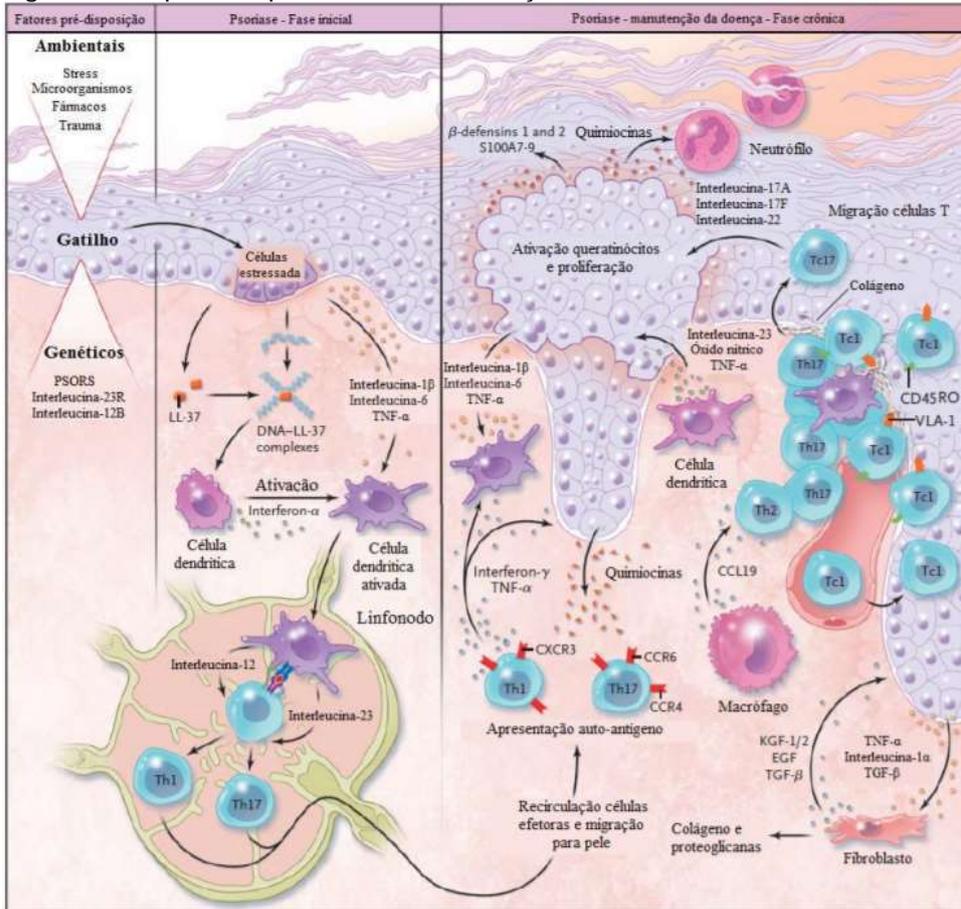
O conteúdo de água na pele psoriática é diminuído em comparação com a pele normal (SERUP; BLICHMANN, 1987). Estudos têm demonstrado também que a perda transdérmica de água (TEWL) em pacientes com psoríase pode estar aumentada em cerca de 2 a 20 vezes. Na psoríase, o nível de TEWL está diretamente relacionado com a gravidade clínica da lesão, de modo que, tanto a aparência inicial da psoríase quanto as alterações fenotípicas da doença são consequências das alterações na função de barreira cutânea (TAGAMI; YOSHIKUNI, 1985; GHADIALLY; REED; ELIAS, 1996; RIM et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2014). O aumento da proliferação e a

diferenciação incompleta de queratinócitos na psoríase favorecem a formação de uma camada córnea altamente desorganizada e conseqüentemente, o aumento da permeabilidade e do fluxo de água (MOTTA et al., 1994b).

Na lesão da pele psoriática, alterações na composição de ceramidas estão associadas com o aumento dos níveis de TEWL pela reduzida função de barreira, apesar de terem sido encontrados os mesmos níveis totais de ceramidas em comparação com o EC da pele normal. Em todos os tipos de placas há redução, sobretudo, do conteúdo de ceramida 1, 3, 4, 5II e 6I (MOTTA et al., 1993; MOTTA et al., 1994b; FARWANAH et al., 2005). O conteúdo lipídico da pele psoriática também encontra-se diferente em relação a ácidos graxos, os quais encontram-se diminuídos em até 46%, em comparação com o EC normal (MOTTA et al., 1994b), o que contribui para hidratação cerca de duas vezes menor do que a pele não acometida pela doença (TAKAHASHI et al., 2014).

Fatores que predispõe o desenvolvimento da doença atuam como gatilho inicial da doença e desencadeiam uma série de eventos inflamatórios e imunológicos (Figura 4). De modo bastante simplificado, pode-se dizer que queratinócitos secretam fatores que ativam células dendríticas dérmicas, as quais ativam células T que, em seguida, diferenciam-se em células T auxiliaadoras do tipo 1 e 17, e voltam para a derme e epiderme, por meio de moléculas de adesão e quimiocinas. As células T ativadas estimulam a liberação de mediadores inflamatórios como interleucinas 1, 2, 6, 12, 15, 17, 22, 23, fator de necrose tumoral alfa interferon-gama, endotelina-1 e eicosanoides, que facilitam a proliferação dos linfócitos T do tipo 1 e 17 e a ativação e proliferação exagerada dos queratinócitos, levando às características clínicas da psoríase (KRUEGER, 2002; SABAT et al., 2007; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009).

Figura 4 - Esquema representativo da evolução imunoinflamatória característica da psoríase.



Fonte: Adaptado de NESTLE; KAPLAN; BARKER (2009).

Apesar de as causas da psoríase não serem ainda totalmente esclarecidas estudos demonstram que a predisposição genética desempenha um papel importante em pelo menos um terço dos portadores. Além da hereditariedade, existem outros fatores que podem desencadear ou agravar a condição clínica, tais como estresse, traumas ou irritações cutâneas, infecções, baixa umidade do ar, ingestão alcoólica e uso de alguns medicamentos (KRUEGER; ELLIS, 2005; STICHERLING, 2005).

A fim de se criar critérios bem definidos e um padrão na medição da gravidade e extensão da psoríase em placas, sobretudo da eficiência do tratamento, Fredriksson e Pettersson (1978) desenvolveram o Índice de Gravidade da Área de Psoríase (PASI, sigla do inglês *Psoriasis Area and Severity Index*).

Nesse instrumento padrão, a intensidade e extensão das placas psoriáticas são calculadas, separadamente, por quatro regiões anatômicas, de acordo com o grau de severidade e a superfície envolvida. O PASI resulta em um simples escore de severidade da psoríase variando entre 0 e 72. Existe ainda a possibilidade de considerar a linha de base como referência para avaliar e comparar a eficácia do

tratamento, sendo então utilizados as taxas de resposta PASI50, PASI75, PASI90 e PASI100, como melhoria de 50, 75, 90 e 100% (LANGLEY; ELLIS, 2004; SCHMITT; WOZEL, 2005; PUIG, 2015).

Embora a psoríase tenha sido anteriormente considerada uma doença que afeta inicialmente apenas a pele e as articulações, tem crescido o número de comorbidades associadas à doença, o que a torna uma potencial desordem sistêmica. A psoríase está relacionada com o aumento de doenças vasculares oclusivas, síndrome metabólica, infecções cutâneas e sistêmicas, câncer e outras doenças imunes (KIMBALL et al., 2008; MENTER et al., 2008).

Seja por afetar principalmente a pele ou pelas comorbidades associadas, a doença compromete de modo bastante significativo a qualidade de vida dos pacientes, principalmente envolvendo baixa autoestima e socialização, exclusão social, depressão e até mesmo suicídio, e por isso é importante o seu tratamento (KRUEGER et al., 2001; EGHILEB; DAVIES; FINLAY, 2007).

O tratamento farmacológico da psoríase objetiva a eliminação dos sinais e sintomas cutâneos e é prescrito de acordo com a severidade da doença, localização das lesões e necessidades do paciente, uma vez que a resposta ao tratamento é bastante individual (MROWIETZ et al., 2011).

Em casos classificados como leves ou moderados são indicados agentes tópicos, como monoterapia ou em associação, os quais geralmente são altamente eficazes e seguros. Dentre esses agentes encontram-se corticoides (dipropionato de betametasona, desonida, propionato de halobetasol e propionato de clobetasol), análogos da vitamina D₃ (calcipotriol e calcitriol), retinoides (tazaroteno), alcatrões (coaltar), ditranol e queratolíticos (ácido salicílico) (MASON; MASON; CORK, 2000; MENTER et al., 2009a).

Medicamentos tópicos são usados como coadjuvantes no tratamento de lesões resistentes ou casos classificados como severos, os quais são geralmente tratados com terapia fotodinâmica ou agentes sistêmicos. São exemplos fármacos quimioterápicos e imunossupressores (MTX, acitretina e ciclosporina) e, recentemente, agentes biológicos (etanercept, infliximab, adalimumab, efalizumab e alefacept) (MENTER et al., 2009b; RUSTIN, 2012).

2.3 METOTREXATO

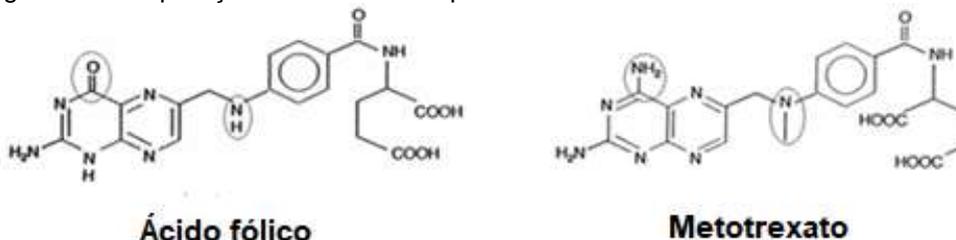
Em 1948, Farber e colaboradores demonstraram a eficiência da aminopterin, um antagonista de ácido fólico, no tratamento de leucemia infantil, sendo o primeiro uso relatado de um agente citotóxico com efeito antiproliferativo. Três anos mais tarde, ao analisar os efeitos anti-inflamatórios desse fármaco, observou-se uma melhora das lesões cutâneas em pacientes com artrite psoriática (GUBNER, 1951).

A eficácia do MTX, derivado da aminopterin, no tratamento da psoríase foi publicada, pela primeira vez em 1958 e, posteriormente, este fármaco se mostrou ser mais efetivo e menos tóxico do que o composto ao qual é análogo (EDMUNDSON; GUY, 1958; REES; BENNETT, 1961). Por fim, no início dos anos 1970, o uso do metotrexato foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da psoríase (ROENIGK JUNIOR; MAIBACH; WEINSTEIN, 1972).

Há mais de 40 anos, o MTX tem sido vastamente utilizado no tratamento sistêmico da psoríase, incluindo a eritrodérmica, a pustular localizada ou generalizada e a artropática, sendo considerado o fármaco de escolha para casos de moderado a grave de psoríase vulgar ou em placas, sobretudo em casos não controlados pela terapia convencional (HAUSTEIN; RYTTER, 2000; MONTAUDIÉ et al., 2011).

MTX é um fármaco antifolato, que apresenta como principais variações estruturais em comparação ao ácido fólico, composto natural do qual é análogo, a substituição do grupo carboxila por um grupo amino no carbono C2 e a metilação do nitrogênio N10 (Figura 5) (RUBINO, 2001).

Figura 5 - Comparação das estruturas químicas do ácido fólico e do metotrexato.



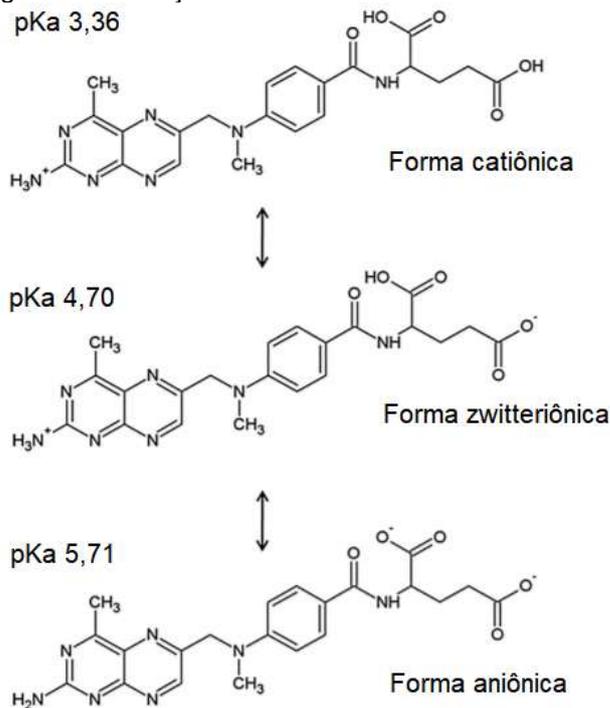
Fonte: Adaptado de RUBINO (2001).

Caracteriza-se por ser um pó cristalino de cor amarela a castanho alaranjada com peso molecular de 454,5 g/mol, quimicamente constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4-diaminosubstituído) ligada à porção a p-aminobenzoil que está ligada à unidade de ácido glutâmico. Possui elevada polaridade (log P= -1,85), praticamente insolúvel em água, clorofórmio, éter e álcool, mas livremente

solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais, hidróxidos e carbonatos alcalinos. É classificado como classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, isto é, apresenta baixa permeabilidade e alta solubilidade, característica que limita sua administração por diversas vias (LEO; HANSCH; ELKINS, 1971; AMIDON et al., 1995; RUBINO, 2001; KASIM et al., 2004; YANG; KAMIYA; GOTO, 2012; O'NEIL, 2013).

Dependendo do pH da solução, o MTX pode estar em diferentes formas iônicas (Figura 6) pois a molécula apresenta dois grupos carboxílicos cujas constantes de dissociações (pKa) são 3,36 (α carboxil) e 4,70 (γ carboxil) e ainda, uma variedade de formas nitrogenadas, sendo provavelmente a mais básica a com grupamento nitrogenado do anel pterina dissociado com pKa de 5,71. Essa característica também influencia a solubilidade da molécula, de forma que o MTX é pouco solúvel em pH ácido e muito solúvel em pH alcalino (POE, 1973; POE, 1977; SANTOS et al., 2017).

Figura 6 - Ionização da molécula de metotrexato.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al (2017).

Como um análogo sintético do ácido fólico, o MTX, em altas concentrações, bloqueia a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) pela inibição da enzima diidrofolato redutase, responsável pela conversão do folato a tetraidrofolato, o que previne a doação de grupos metil durante a síntese de purinas, pirimidinas e, sobretudo, timidilato, os quais são essenciais na síntese de DNA e na divisão celular (JOLIVET et al., 1983; OLSEN, 1991). Como consequência há redução da entrada de

novas células nesta fase e a morte de células que já estejam nela, o que provoca uma redução da hiperacantose típica da psoríase (WEISNTEIN; VELASCO, 1972).

Essa atividade antimetabólica do MTX levou a teorias de que o fármaco traria benefícios clínicos por interferir na proliferação de células da epiderme. Weinstein, Goldfaden e Frost (1971) demonstraram que esse mecanismo de ação indica que o MTX quando administrado sistêmica ou intralesionalmente inibe a síntese de DNA nos queratinócitos na epiderme psoriática e interrupção de mitoses por várias horas, com efeito menos pronunciado em células normais da epiderme, pois as células doentes encontram-se em rápida proliferação.

Anos mais tarde, Heenen e colaboradores (1998) encontraram células mortas depois de 5 dias de tratamento com baixas doses de MTX, com morfologia bastante característica. Esses dados sugeriram que concentrações terapêuticas do fármaco são capazes de induzir a apoptose de queratinócitos em vez de reduzir a hiperproliferação dos queratinócitos.

A apoptose de queratinócitos parece ser fundamental no controle da morfologia epidermal e na supressão da apoptose necessária para a homeostase da pele e tem sido propostas como possíveis mecanismos responsáveis pela espessura da epiderme na psoríase. Nesse sentido, estudo realizado por Elango e colaboradores (2017) em 58 pacientes com psoríase tratados com MTX, observou-se um significativo aumento do citocromo *c* e da proteína *c* e da expressão gênica da caspase-9 clivada, eventos relacionados com via intrínseca de ativação da apoptose e relacionados com os resultados benéficos observados nos pacientes após 12 semanas de tratamento.

Apesar disso, atualmente, acredita-se que a ação anti-inflamatória e imunomoduladora do MTX, em baixas doses, sejam os principais efeitos do fármaco na psoríase (ZANOLLI; SHERERTZ; HEDBERG, 1990).

O MTX parece ser capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilos na epiderme em resposta a aplicação tópica de leucotrienos B₄ e C_{5a}. Em pacientes com psoríase, o MTX inibe a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos e, conseqüentemente, reduz a atividade de citocinas (KERKHOF; BAUER; MAASSEN-DE GROOD, 1985; TERNOWITZ; HERLIN, 1985).

Na psoríase, a expressão cutânea e sistêmica de várias citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23) e interferon-gama (*IFN-γ*) tem sido demonstrada. À essas citocinas atribui-se à composição celular do infiltrado inflamatório nas placas psoriáticas e à

hiperproliferação dos queratinócitos (WOJAS-PELC et al., 2007). Nesse sentido, diversos estudos evidenciaram a redução de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-22, com o tratamento com MTX (TERANISH et al., 1995; MEEPHANSAN et al., 2011; ELANGO et al., 2012; TAMILSELVI et al., 2013).

Alguns estudos ainda, sugerem que sua atividade anti-psoriática se deva a sua propriedade imunossupressora, uma vez que a proliferação de macrófagos e células T *in vitro* é cerca de 1000 vezes mais sensível aos efeitos citotóxicos do MTX em comparação com queratinócitos. Outros, por sua vez, atribuem o efeito desse fármaco na psoríase pela inibição da ativação e expressão dessas células e também pela redução da expressão de certas moléculas de adesão, que são essenciais para o desenvolvimento da doença (BAKER; FRY, 1992; JEFFES et al., 1995; MAJUMDAR; AGGARWAL, 2001; SIGMUNSDOTTIR et al., 2004; JHONSTON et al., 2005; TORRES-ÁVAREZ et al., 2007).

Outras evidências sugerem que esses efeitos do MTX estejam relacionados com a formação de poliglutamatos intracelulares e com o aumento da formação de adenosina, um potente mediador endógeno anti-inflamatório (BAGGOTT; VAUGHN; HUDSON, 1986; CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993).

Diversos esquemas posológicos podem ser adotados e frequentemente a via de administração no tratamento da psoríase é a oral, apesar de ser prescrito por dermatologistas também injeção intramuscular ou subcutânea. Dois regimes terapêuticos são usualmente empregados: uma dose única oral semanal ou a dose subdividida em três administrações, com intervalo de 12 horas. A dose para regimes com única administração semanal é de 7,5 mg a 30 mg enquanto que para doses divididas esta fica entre 2,5 e 5 mg semanal, podendo-se aumentar, gradativamente, 2,5 mg por semana não ultrapassando um total de 30 mg por semana (ROENIGK et al., 1998; GYULAI et al., 2015).

Apesar da inegável experiência clínica do tratamento de pacientes com psoríase com MTX, existem limitados estudos que avaliam a eficácia do fármaco, sobretudo em monoterapia (PATHIRANA et al., 2009).

Em estudo realizado por Yazici et al. (2005), observou-se uma resposta clínica favorável em todos os pacientes tratados com MTX oral, com doses semanais entre 10 e 25 mg, de modo que o índice PASI foi reduzido a $3,37 \pm 1,94$ e exames histológicos revelaram diminuição de células inflamatórias e retorno do EC à normalidade. Doses de 25 mg de MTX foram mais eficientes como monoterapia para o tratamento de

psoríase severa, possibilitando PASI 100 em 69% dos pacientes enquanto que doses de 10 mg permitiram esse índice em apenas 30% dos pacientes, além de os resultados aparecerem mais lentamente (DOGRA; KRISHNA; KANWAR, 2012). Em 2013, Tamilselvi e colaboradores demonstraram que pacientes tratados com 7,5 mg de MTX uma vez por semana tiveram uma redução do PASI de $26,80 \pm 9,76$ para $5,77 \pm 3,64$ após 12 semanas e 75% dos pacientes apresentaram PASI maior que 75. Em estudo recente realizado por Warren et al. (2017) com 120 pacientes com psoríase em placas nos graus moderado a grave de quatro países europeus diferentes tratados com injeção subcutânea de MTX com doses de 17,5 mg ou 22,5 mg do fármaco, 41% dos pacientes alcançaram PASI 75 na 16ª semana de tratamento.

Apesar da eficiência do MTX na redução da extensão e gravidade da psoríase esse fármaco pode induzir uma série de distúrbios como náuseas, desconforto abdominal, vômitos, úlceras gástricas, fadiga, cefaleia, vertigem, leucopenia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia, queda de cabelo, mucosite oral, osteopatias, hepato e nefrotoxicidade, efeitos que são mais pronunciados na administração oral e que encontram-se entre os que mais contribuem para a descontinuação do tratamento da psoríase com esse fármaco em mais da metade dos pacientes (DOOREN-GREEBE et al., 1994; ZONNEVELD et al., 1996; WIDEMANN; ADAMSON, 2006; DUE et al., 2012; KIVITI et al., 2014).

O desenvolvimento de uma formulação tópica de MTX poderia ser interessante para o tratamento da psoríase devido à possibilidade de fornecer o tipo de tratamento preferido por cerca de 70% dos pacientes com essa patologia e otimizar a localização do fármaco diretamente na pele lesionada, uma vez que existem evidências que sugerem que o MTX age diretamente na placa psoriática. Essa alternativa terapêutica também seria capaz de superar inconvenientes associados à administração oral do fármaco tais como variações na absorção intestinal e metabolismo de primeira passagem, além de eliminar efeitos adversos sistêmicos associados às vias tradicionais de administração (WEINSTEIN; GOLDFADEN; FROST, 1971; NEWBURGER; WEINSTEIN; MCCULLOUGH, 1978; DOOREN-GREEBE et al., 1994; LEBWOHL et al., 1995; CHLADEK et al., 1998; TIAN, CRONSTEIN, 2007; DALRYMPLE et al., 2008).

2.4 FORMULAÇÕES TÓPICAS COM METOTREXATO PARA O TRATAMENTO DA PSORÍASE

Diversos estudos foram feitos propondo diferentes veículos para a liberação tópica do MTX, mas os resultados encontrados foram inicialmente insatisfatórios. Scott e Reinertson (1959) e Nurse (1963) relataram a ineficácia do MTX tópico na psoríase e do mesmo modo, Comaish e Juhlin (1969), em estudo realizado com 20 pacientes tratados com MTX em creme, não encontraram resultados clínicos. Stewart, Wallace e Runiks (1972) não detectaram o fármaco na pele após aplicação tópica em pacientes psoriáticos e sugeriram assim como McCullough et al. (1976) que, quando aplicado topicamente, o MTX afetaria apenas as placas, por possuir baixa capacidade de penetração cutânea, o que, conseqüentemente, limita sua eficácia (BALL; MCCULLOUGH; WEINSTEIN, 1982; WEINSTEIN; MCCULLOUGH; OLSEN, 1989).

De fato, características próprias da molécula tais como hidrossolubilidade, peso molecular e dissociação no pH fisiológico dificultam a penetração do MTX através do lipofílico EC (MCCULLOUGH et al., 1976; POE, 1977; VAIDYANATHAN; CHAUBAL; VASAVADA, 1985; TROTTA et al., 2004; AMARIJI et al., 2016).

Em vista disso, em um segundo momento, outros estudos bem-sucedidos foram feitos a fim de desenvolver novos sistemas e/ou aplicar recursos físicos que favorecessem a liberação e penetração do MTX no tecido cutâneo e, ao mesmo tempo entender mais detalhadamente os fatores envolvidos nesses processos. Estes estudos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(continua)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Dispersões	Água, N-cedilmetil sulfóxido e veículo N (álcool, laureth-4, propilenoglicol e álcool isopropílico)	Aumento da penetração cutânea do MTX <i>in vitro</i> com veículo N, inibição da síntese de DNA epidermal <i>in vivo</i> , sem efeito sistêmico	BALL; MCCULLOUGH; WEINSTEIN, 1982
Dispersão	Propilenoglicol	Solubilização e penetração dependente de pH	VAIDYANATHAN; CHAUBAL; VASAVADA, 1985
Gel com promotor de aborção cutânea	Gel com Azone® (laurocapram)	Melhora global de 50% ou mais dos sinais da psoríase nos pacientes tratados com gel por 6 semanas	WEINSTEIN; MCCULLOUGH; OLSEN, 1989
Gel com promotor de aborção cutânea	Gel com Azone® (laurocapram)	Azone® (laurocapam) é um promotor de permeação eficiente para o MTX	BRAIN et al., 1991
Gel, creme e pomada	Gel aquoso, álcool graxo, propilenoglicerol, etanol, antioxidantes, conservantes, tensoativos não iônicos, cotensoativo e miristato de isopropila	Absorção de MTX na pele a partir da pomada foi menor do que com gel e creme, sendo este mais estetica e dermatologicamente aceitável	HWANG et al., 1995
Microemulsão	Decanol, lecitina de soja, álcool benzílico, propilenoglicol, monodecil glicerofosfato, monoctil fosfato, monodecil fosfato, dodecil sulfato de sódio e dioctil sulfocionato, taurodeoxicolato	Permeação do MTX é associada à lipofilia do fármaco devido à formação de par iônico	TROTTA; PATTARINO; GASCO, 1996
Gel	Propilenoglicol, etanol e comprimidos de MTX	Eficácia do MTX tópico em pacientes com psoríase palmoplantar	RAVI; KAUR; KUMAR, 1999
Hidrogel e microemulsão com iontoforese	Ácido acrílico, N-N'-metilenobis-acrilamida, Labrasol®, Plurol Isoesteárico®, oleato de etila, NaCl, Tween 80, Span 80, 1,2octenodiol e miristato de isopropila	A liberação iontoforética a partir do hidrogel e a liberação passiva a partir das microemulsões foram maiores do que controle, MTX em quantidades significativas na pele	ALVAREZ-FIGUEROA; BLANCO-MÉNDEZ, 2001

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(continuação)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Solução com iontoferese	Tampão HEPES e cloreto de sódio	A iontoferese aumentou a permeabilidade e o acúmulo de MTX na pele e a liberação foi diminuída pelo aumento da concentração de sal	ALVAREZ-FIGUEROA; DELGADO-CHARRO; BLANCO-MÉNDEZ, 2001
Gel com promotor de aborção cutânea	Gel com Azone® (laurocapram)	Melhoria limitada da condição da psoríase, sobretudo no tamanho e espessura das lesões, não foram encontradas quantidades detectáveis no plasma e anormalidades laboratoriais	SUTTON et al., 2001
Gel	Hidroximetilcelulose	Redução do índice PASI e eliminação de placas, exames laboratoriais normais	SYED et al., 2001
Lipossomas deformáveis	Fosfatidilcolina, lecitina hidrogenada e glicerina dipotássica	Lipossomas deformáveis foram de três a quatro vezes mais eficientes na permeação de MTX em comparação com lipossomas normais, até 50% da dose foi encontrada na pele	TROTТА et al., 2004
Solução e lipossomas com eletroporação e iontoforese	Tampão fosfato e dimiristoilfosfatidilserina	Eletroporação associada ao uso de lipossomas favoreceram a melhor penetração	WONG, T-W.; ZHAO, Y-L.; HUI, S. W., 2005
Gel	Hidroximetilcelulose	Boa tolerância, redução do eritema, infiltração leucocitária e dimensão das lesões	ESKICIRAK; ZEMHERI; CERKEZOGLU, 2006

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(continuação)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Etossomas	Fosfatidilcolina de soja e etanol	Etossomas penetraram mais eficazmente a pele que lipossomas convencionais, otimização do fármaco na epiderme e na derme	DUBEY et al., 2007
Niossomas	Niossomas e gel de quitosana	Formulação niossomal eficaz em reduzir eritema, descamação e infiltrado leucocitário melhor tolerabilidade e adesão do paciente, melhora da estabilidade do fármaco	LAKSHMI et al., 2007
Emplastro de hidrogel com iontoforese	Acrilamida, ácido acrílico, poliacrilamida, N,N-metileno bis acrilamida, etanol, limoneno, eucaliptol e mentol	Iontoforese com onda quadrada, mentol e etanol associados permitem uma maior permeação	PRASAD et al., 2007
Lipossomas fotossensíveis com laser	1,2 dipalmitoil-sn-1-fosfatidilcolina, lectina de soja, fosfatidilcolina de ovo, colesterol e Carbomer 974 NF	Não houve detecção de MTX no soro de nenhum dos animais, gel com lipossoma seguido de sessões de laser foi melhor na redução de eritema, descamação e infiltrado dos controles, liberação do fármaco dependente diretamente da energia do laser aplicado	ALI et al., 2008
Solução com laser e eletroporação	Tampão citrato fosfato	Laser e eletroporação aumentaram a retenção de MTX, a combinação de laser como pré tratamento e com posterior eletroporação foi mais eficaz em aumentar a retenção do que qualquer técnica sozinha	LEE et al., 2008
Lipossomas ultradeformáveis	Fosfatidilcolina de soja, colesterol, colato de sódio e gel de carbopol	Pacientes tratados com gel lipossomal tiveram PASI mais reduzido do que os tratados com gel com fármaco livre	VANAJA; SHOBHA RANI; SACCHIDANANDA, 2008

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(continuação)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Emplastro de hidrogel com iontoforese	Acrilamida, ácido acrílico, poliacrilamida, N,N-metileno bis acrilamida, acetato de etila, etanol e mentol	Iontoforese com onda quadrada, acetato de etila, mentol e etanol associados permitiram uma maior permeação	PRASAD et al., 2009
Carreadores lipídicos nanoestruturados (MTX e calcipotriol)	Precirol (R) ATO 5, esqualeno, Myverol e Pluronic® F68	Aumento da hidratação cutânea promoveu maior penetração de MTX	LIN et al., 2010
Nanogel	N-isopropilacrilamida, N-N'-metilenobis-acrilamida, persulfato de potássio e bicarbonato de sódio	Liberação de MTX a toda epiderme, redução significativa de prostaglandina, aumento da atividade biológica e liberação com adição de bicarbonato	SINGKA et al., 2010
Gel com promotor de aborção cutânea	Carbomer 934, propilenoglicol, 2-propanol, dietilenoglicol monoetil éter (Transcutol P), lauril sulfato de sódio, cloreto de alquil dimetil benzil e ácido salicílico	Transcutol® a 2% proporcionou melhores taxas de permeação, especialmente quando associado ao ácido acetilsalicílico em concentração de 6%	JAVADZADEH; HAMISHEHKAR, 2011
Lipossomas (MTX e mentol)	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada e de ovo, colesterol, Carbopol 934p, glicerol, mentol e Tween 80	Liberação controlada e aumento da retenção cutânea do MTX principalmente com a presença de mentol, aumento da biodisponibilidade em apêndices da pele, redução da paraqueratose em comparação com controles	NAGLE et al., 2011
Lipossomas deformáveis	Fosfolípideo de soja Epikuron® 200 (fosfatidilcolina), lecitina hidrogenada Phospolipon® 90H, colesterol e ácido oleico	Lipossomas contendo ácido oleico promoveram maior acúmulo de MTX na pele	SRISUK et al., 2012

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(continuação)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Peptídeo com penetração celular	Peptídeo Hph-1-PTD	Redução dos sinais e sintomas de psoríase induzida por imiquod, redução do infiltrado inflamatório na epiderme e derme	BYAMBA et al., 2014
Niossomas (MTX e trioxisaleno)	Colesterol, DMSO e Span 85	Ortoqueratose de 25%, associação eficaz	PARNAMI et al., 2014
Nanocarreadores lipídicos	Witepsol® S51, ácido oleico, Tween 60 e Tween 80	Liberação prolongada, aumento da penetração do MTX, fármaco retido na pele sobretudo com polissorbatos 60	PINTO et al., 2014
Niossomas	Span 60, colesterol e diacetil fosfato	Suspensão com niossomas favorecem maior retenção cutânea do que solução injetável aplicada topicamente	ABDELBARY; ABOUGHALY, 2015
Microemulsão	Fosfolipídeo 90G, etanol, Tween 80, palmitato de isopropil e Polaxamer 407	Retenção do fármaco em todas as camadas da pele com redução de absorção sistêmica, entretanto, a dexametasona foi mais eficaz	AMARIJI et al., 2016
Nanocarreadores lipídicos	Precirol ATO 5, Captex 300, Polaxamer 407 e gel de Carbopol	Liberação sustentada por 48 horas, redução do índice PASI, pele normal com ceratose leve	AVASATTHI et al., 2016
Nanopartículas de ouro	Nanopartículas de ouro	Liberação rápida, nanopartículas mais retidas na epiderme	BESSAR et al., 2016
Cristal líquido e microemulsão	Poliéter funcional siloxano, silicone fluido de copolímero glicol e Carbopol P NF	Perfil da administração dependente da estrutura do sistema administrado, liberação controlada com cristais líquidos, sistemas obtidos possuem características de textura e biadesão adequadas para a aplicação na pele	CINTRA et al., 2016
Nanocarreadores lipídicos	Palmitato de cetila, Migyiol® 812 e Tween 80	Uso de lipídeos biocompatíveis, favorecimento da permeação em queratinócitos <i>in vitro</i>	FERREIRA et al., 2016

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos exitosos com o metotrexato administrado por via cutânea para o tratamento da psoríase.

(conclusão)

Sistema de liberação	Materiais empregados	Principais resultados	Referência
Lipossomas ultradeformáveis	Fosfatidilcolina, colato de sódio, Tween 80 e colesterol	Lipossomas mais deformáveis e com maior penetração na pele, sobretudo com Tween 80 como ativador de borda	ZEB et al., 2016
Nanopartículas lipídicas sólidas de MTX e etanercept em gel	Palmitato de cetila, Tween 80 e Carbopol 934	Liberação de MTX sustentada, quantidades terapêuticas na pele e redução da permeação transdérmica, associação efetiva	FERREIRA et al., 2017
Biocompósito e membrana	Celulose de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> e carboximetilcelulose	Controle da liberação do fármaco por biomateriais	FONTES et al., 2018
Nanogel	Quitina, metanol e cloreto de cálcio	Retenção do fármaco na epiderme e derme, redução da atividade de enzimas inflamatórias, 92% do fármaco liberado em 5 dias	PANONNUMMAL; SABITHA, 2018

Fonte: Do autor (2018).

A partir desta revisão de literatura, pode-se observar que há cerca de três décadas houve uma tendência em associar MTX a hidrogeis, promotores físicos e químicos de permeação ou emolientes. Mais recentemente, deu-se maior destaque para o desenvolvimento de sistemas lipídicos e nanoestruturados como lipossomas, nanocarreadores lipídicos, microemulsões e cristais líquidos. Na maioria dos estudos, observa-se uma melhora da retenção cutânea do fármaco e recuperação da pele com essa recente proposta.

2.5 SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS

Os cristais líquidos, apesar de ainda pouco reportados para uso específico como veículo para MTX, podem oferecer vantagens para a aplicação e tratamento tópico da psoríase. De fato, recentemente, sistemas de liberação de fármacos baseados em cristais líquidos tem sido desenvolvidos para o tratamento da psoríase e resultados promissores tem sido obtidos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LOPES et al., 2006; VICENTINI et al., 2013; DEPIERI et al., 2016; ROSSETI et al., 2016).

Agentes tensoativos caracterizam-se pela presença de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica em sua molécula. Quando se encontram diluídos em água, suas moléculas organizam-se na forma de monômeros, os quais tendem a buscar a superfície e orientar-se de modo a reduzir a área de contato do grupo hidrofóbico com o meio aquoso, alcançando desse modo um estado de energia livre mínimo. Com o aumento da concentração, a camada superficial torna-se saturada de moléculas de tensoativo, cuja parte hidrofóbica passa a se proteger do meio aquoso agora por meio da formação de micelas. Micelas são agregados esféricos que possuem um intercâmbio contínuo e rápido de monômeros com o meio externo, o que resulta em um agregado de alta mobilidade e elevado grau de desorganização. A concentração de tensoativos em que ocorre a micelização é denominada de concentração micelar crítica (CMC) (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; FAIRHURST et al., 1998).

Os agregados de tensoativos, em diferentes concentrações, tornam-se mais estruturados quando uma substância oleosa ou um álcool é adicionado ao sistema tensoativo-água. Dessa forma, emulsões, microemulsões e diferentes nanoestruturas ou mesofases de sistemas líquido cristalinos podem ser formados (EZRAHI; ASERIN; GARTI, 1999).

Cristais líquidos são definidos como um estado da matéria que apresenta propriedades mecânicas intermediárias entre líquidos isotrópicos e sólidos cristalinos. A diferença entre cristais sólidos e líquidos isotrópicos é o estado de ordem, enquanto nesses as moléculas livremente se difundem, naqueles as moléculas encontram-se em alto grau de organização (SINGH, 2000). Quanto à aparência, os cristais líquidos assemelham-se a géis de translúcidos a transparente, dependendo da composição e da temperatura do sistema (ALAM; ARAMAKI, 2008). Em relação às mesofases mais importantes e comumente observadas tem-se a cúbica, hexagonal e lamelar (HOLMBERG et al., 2002; ISRAELACHIVILI, 2011).

A fase cúbica compreende micelas dispostas em bicamada curva que se estende em três dimensões e dois nano-canais aquosos interpenetrantes, mas sem contato, podendo ser normal ou reversa. Apresenta-se geralmente na forma de gel viscoso e semissólido, opticamente isotrópico - campo escuro ao ser observado sob um microscópio de luz polarizada (ANDERSON; GRUNER; LEIBLER, 1988; TYLE, 1989; CHUNG; CAFFREY, 1994; TEMPLER, 1998).

A fase hexagonal é constituída por estruturas micelares fechadas e estendidas, na qual infinitas hastes de água dispõem-se em uma rede bidimensional e separam-se por bicamadas lipídicas, ou vice-versa, formando micelas reversas ou normais, respectivamente. Apresenta-se na forma de gel com viscosidade intermediária entre fase cúbica e lamelar e opticamente anisotrópico. Sua textura óptica é frequentemente identificada pela observação de uma textura fibrosa ou em forma de leques, devido aos domínios cônicos das colunas (TIDDY, 1980; FAIRHURST et al., 1998; HYDE, 2001; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001; KAASGAARD; DRUMMOND, 2006).

A alta viscosidade dos cristais líquidos, como fases cúbicas e hexagonais se deve à estrutura tri e bidimensional, respectivamente. Mesofases lamelares, por sua vez, possuem um longo alcance unidimensional, o que lhe proporciona uma viscosidade bastante baixa (MÜLLER-GOYMANN, 2004). Não coincidentemente, as membranas das células do corpo humano e os lipídeos no EC (MADISON et al., 1987) estão em um estado líquido cristalino lamelar. Essa organização permite uma combinação de robustez, flexibilidade e semipermeabilidade necessárias à vida (LAGERWALL; SCALIA, 2012).

A fase lamelar é composta por bicamadas lipídicas intercaladas por fases aquosas, nas quais os grupamentos polares das moléculas encontram-se adjacentes e projetados para a interface aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente. Apresenta-se na forma de líquido viscoso, com a mais baixa viscosidade dentre as mesofases líquido cristalinas, como explicitado anteriormente e opticamente anisotrópico. Se distingue, opticamente, por exibir a característica textura de cruz de Malta, ou menos frequentemente, pela textura em espiral (TIDDY, 1980; MCGRAFTH; KLÉMAN, 1993; ECCLESTON et al., 2000; GABRIEL et al., 2001; HYDE, 2001).

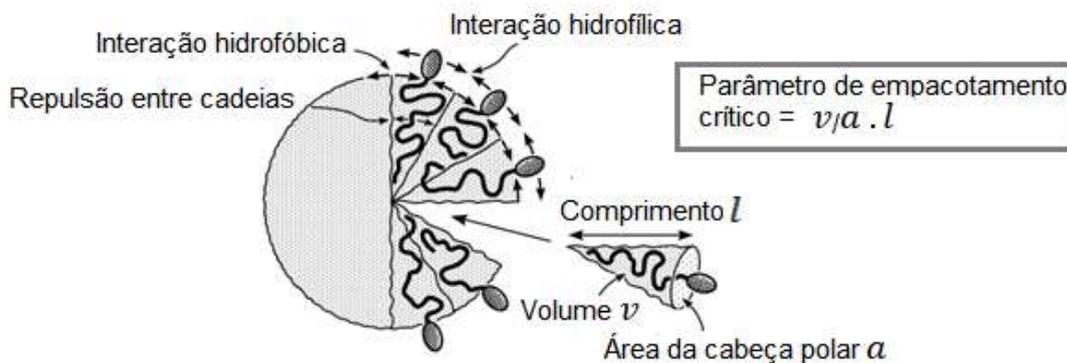
O parâmetro de empacotamento crítico (PEC) é utilizado para estimar a mesofase líquido cristalina preferencialmente formada por determinado tensoativo relacionando formato da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da

interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado. O PEC pode ser calculado através da seguinte equação (ISRAELACHIVILI; MITCHELL; NINHAM, 1976; MITCHELL; NINHAM, 1981):

$$PEC = \frac{v}{a \cdot l}$$

Onde v é volume da cadeia hidrofóbica, a é área da cabeça polar e l é o comprimento da cadeia hidrofóbica (Figura 7).

Figura 7 - O parâmetro de empacotamento crítico (PEC) relaciona a área da cabeça polar, o tamanho da cadeia e o volume da cadeia hidrofóbica.

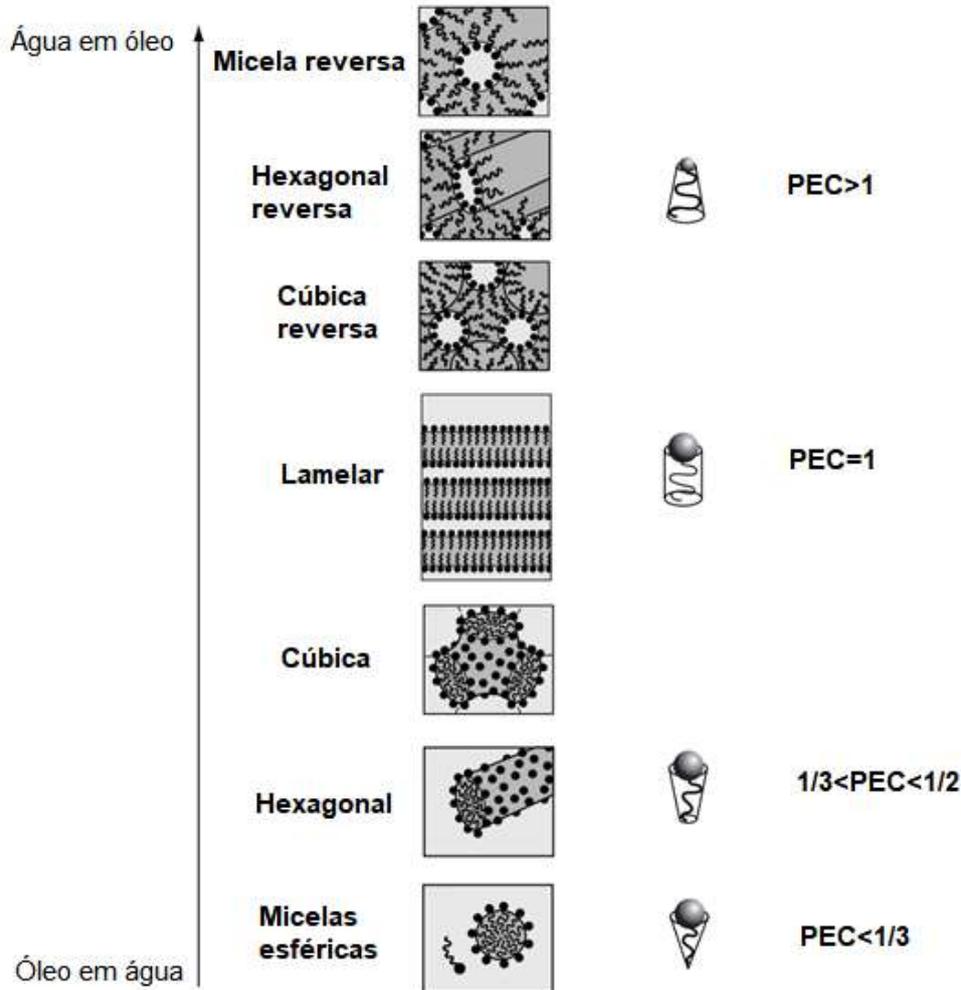


Fonte: Adaptado de ISRAELACHIVILI (2011).

Dependendo do valor de PEC (Figura 8), podem ser formadas diferentes estruturas auto organizáveis. Tensoativos com cadeias simples e grandes áreas de cabeças polares formam micelas esféricas ($PEC < 1/3$), tensoativos com cadeias simples e áreas de cabeças polares intermediárias formam micelas cilíndricas, características de fase hexagonal ($1/3 < PEC < 1/2$), tensoativos com cadeias duplas e áreas de cabeças polares grandes formam várias estruturas interconectadas, características de fase cúbica ($1/2 < PEC < 1$), tensoativos com cadeias duplas e áreas de cabeças polares pequenas formam vesículas e bicamadas flexíveis, características de fase lamelar ($PEC = 1$) e, por fim, valores de $PEC > 1$ formam estruturas reversas (ISRAELACHIVILI, 1994; HOLMBERG et al., 2002; SAGALOWICZ et al., 2006).

A geometria dos agregados formados depende também de outros fatores como composição da mistura, concentração dos componentes, força iônica, temperatura, pressão e pH (ISRAELACHIVILI, 1994; BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; YAGHMUR et al., 2009), de modo que alterações nesses parâmetros podem proporcionar mudança de fase.

Figura 8 - Parâmetros de empacotamento crítico (PEC) de moléculas de tensoativo e estruturas auto-organizadas preferencialmente formadas.



Fonte: Adaptado de HOLMBERG et al. (2002) e ISRAELACHIVILI (2011).

A versalidade estrutural dos sistemas líquido cristalinos, que corresponde a domínios hidrofílicos e lipofílicos, permite a incorporação de uma série de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfílicas (irinotecano, glicose, paclitaxel, histidina, octreotida, vitamina K, resveratrol, etc.). Moléculas hidrofílicas localizam-se próximas à cabeça polar do tensoativo ou nos domínios de água, enquanto moléculas lipofílicas localizam-se dentro dos domínios lipofílicos e as moléculas anfílicas, na interface (BOYD et al., 2006; SAGALOWICZ et al., 2006; FUJIMURA et al., 2016).

Cristais líquidos podem proteger fármacos de diferentes tipos de degradação e instabilidade. A capacidade de fases cúbicas em proteger fármacos lábeis, como cefuroxima e cefazolina, de reações de instabilidade química, tais como hidrólise e oxidação, e de instabilidade física, como a agregação molecular de insulina tem sido demonstrada (SADHALE; SHAH, 1998, 1999).

Mesofases líquido cristalinas têm ainda a capacidade de promover uma sustentada ou controlada liberação de fármacos. Aceita-se que a maioria liberação de fármacos a partir de cristais líquidos segue a cinética de Higuchi, entretanto, o comportamento da liberação está relacionado com aspectos tais como conteúdo inicial de água, propriedades da molécula incorporada, tipo de mesofase, interação eletrostática entre fármacos, estado de ionização do fármaco (CLOGSTRON; CAFFREY, 2005; CLOGSTRON et al., 2005; SHAH; PARADKAR, 2007; LEE et al., 2009; GUO et al., 2010).

À aplicação tópica de sistemas líquido cristalinos é atribuído o aumento da retenção cutânea ou penetração nas camadas mais profundas da pele com consequente liberação transdérmica de fármacos (LOPES et al., 2006). Em estudo realizado por Bender e colaboradores (2005) a aplicação de ácido δ -aminolevulinico e seu metil éster incorporados em diferentes sistemas líquido cristalinos mostrou mais rápida penetração em comparação com padrão (pomada) durante períodos curtos e longos. Praça e colaboradores (2012) verificaram que há diferença da penetração cutânea de tetrasulfonato de ftalocianina de zinco de acordo com a mesofase empregada, de modo que fases hexagonais favoreceram uma considerável penetração *in vitro*. Lee e colaboradores (2015) evidenciaram diferenças significativas na quantidade de palmitato de retinol na derme com a aplicação de fases lamelares em comparação com emulsões convencionais em 6 horas de estudo.

Cristais líquidos também apresentam vantagens especiais à pele pois exibem propriedades hidratantes (NESSEEM, 2001). Savic e colaboradores (2011) verificaram uma redução de TEWL e consequente aumento da hidratação, em voluntárias saudáveis, com a aplicação tópica de fases lamelares com e sem glicerol. A eficácia na hidratação cutânea a partir de cristais líquidos é maior do que aquela encontrada com a aplicação de emulsões convencionais (IWAI; FUKASAWA; SUZUKI, 1998). Fases lamelares, de maneira especial, ainda possuem alta similaridade com o espaço intercelular da matriz lipídica córnea o que as torna altamente recomendáveis para uso tópico (VYAS; JAITLEY; KANAUIA, 1997; DING; CHEN; GUO, 2006).

Sistemas líquido cristalinos são também conhecidos por serem termodinamicamente estáveis, o que permite com que sejam estocados por longos períodos sem que haja coalescência, floculação e separação de fases, (MAKAI et al., 2003; DUNCKE et al., 2016). Ito e colaboradores (2012) descreveram uma maior

estabilidade de emulsões contendo cristais líquidos, nas quais as micelas se mantiveram até 60 dias após o preparo das formulações. De acordo com Liu e Friberg (2009), os cristais líquidos podem reduzir a mobilidade do tensoativo dificultando a coalescência.

Do mesmo modo, os cristais líquidos são extremamente atrativos do ponto de vista tecnológico devido ao fato de possibilitarem produção em escalonamento e capacidade de possibilitarem o controle da viscosidade e da textura do sistema (LAGERWALL; SCALIA, 2012). Além disso, propriedades bioadesivas também contribuem para seu uso como sistema de liberação de fármacos (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

2.6 LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS COMO EMOLIENTES CUTÂNEOS

Emolientes são usados no tratamento de distúrbios cutâneos por sua capacidade de tratar a pele seca e escamosa, aumentar a hidratação e melhorar as características sensoriais da pele (LODÉN, 2003, 2012). Na psoríase, em especial, seu uso é essencial como adjuvante tópico no tratamento da doença, visto que possibilita o reparo da função de barreira da pele e a reidratação do EC, eventos esses associados à redução da severidade da patologia (WITMAN, 2001; FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008; PROKSCH, 2008).

Essa eficácia de emolientes já fora reportada na literatura por alguns pesquisadores. Rim e colaboradores (2005) observaram que o uso de emoliente tópico melhorou o aspecto visual de peles acometidas por psoríase, aumentou a capacitância elétrica cutânea e diminuiu a TEWL durante 6 meses de tratamento. Em outro estudo, Seite e colaboradores (2009) demonstraram que o uso de emolientes se mostrou eficaz na redução da secura da pele e prurido e por isso, pode ser ideal como terapia de manutenção após corticoterapia tópica em pacientes com psoríase leve. O benefício do uso de emolientes também foi encontrado por Lakshimi e Bhaskaran (2011) cujo uso de gel niossomal de ureia reduziu a severidade da doença, a descamação, o eritema e o infiltrado leucocitário em pacientes com psoríase palmoplantar ou psoríase vulgar.

A porcentagem de lipídeos em cremes tem sido apontada como crucial para o efeito obtido porque, experimentalmente, a taxa de recuperação de peles danificadas

correlaciona-se com a quantidade de lipídeos presentes na formulação (HELD; LUND; AGNER, 2001).

Por outro lado, estudos sugerem que as diferenças de efeito entre emolientes se deva aos diferentes tipos de lipídeos empregados, pois apesar de serem tidos como inativos, esses teoricamente podem agir em três diferentes níveis: um efeito imediato oclusivo, adicionando uma mistura lipídica à superfície da pele; um efeito intermediário, adicionando uma mistura lipídica aos espaços intercelulares e um efeito retardado, fornecendo lipídeos para as células da epiderme o que permite a normalização da síntese lipídica e sua posterior secreção (LODÉN; LINDBERG, 1991; HALKIER-SORENSEN, 1996).

O tratamento para peles com a barreira córnea comprometida consiste, principalmente, na utilização de lipídeos não fisiológicos, como o petrolato. Imediatamente após sua aplicação, a superfície cutânea tem seu aspecto modificado, se tornando mais macia. Tal evento se deve ao acúmulo de água no EC por seu efeito oclusivo, sem entretanto, uma concomitante alteração na taxa de reparo da pele, pois esses lipídeos ficam restritos apenas no EC (GHADIALLY; HALKIER-SORENSEN; ELIAS, 1992; MAO-QIANG; BROWN; WU-PONG, 1995).

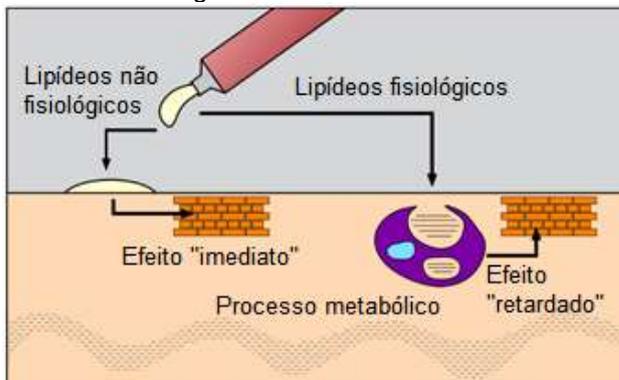
Doenças cutâneas, como dermatite atópica, dermatite de contato irritante, ictiose lamelar e psoríase são caracterizadas por terem a função de barreira prejudicada pela depleção ou pelos defeitos subsequentes na organização de lipídeos fisiológicos (LF) como ácidos graxos, colesterol e ceramidas, no EC (BERARDESCA et al., 2001; PILGRAM et al., 2001; BOUWSTRA; PONEC, 2006; NAKAJIMA et al., 2013). Desta forma, esses lipídeos têm importante papel na promoção da homeostase cutânea.

A penetração cutânea de substâncias aplicadas topicamente depende de algumas características próprias da molécula como lipossolubilidade e massa molecular, de modo que aquelas que possuem massa molecular inferior a 500 e com adequada solubilidade têm a capacidade de penetrar peles intactas. Muitos dos LF possuem massa molecular (MM) inferior a 500, a exemplo do colesterol (MM=387), ácido esteárico (MM=284) e ácido linoleico (MM=280). Apesar de as ceramidas presentes em emolientes possuírem peso molecular entre 500 e 900, diferentes preparações têm apresentado sucesso em proporcionar e controlar a penetração dessas moléculas em camadas mais profundas da pele (JAKASA et al., 2006; BYUN et al., 2012; SAHLE, WOHLRAB; NEUBERT, 2014). Sendo assim, é provável que

essas três classes de lipídeos penetrem a pele humana em suas camadas viáveis, sobretudo em condições em que a barreira cutânea esteja danificada (SLOAN; WASDO; RAUTIO, 2006).

Experimentalmente, o tratamento com LF pode ter um efeito imediato semelhante ou um pouco inferior aos oclusivos no que se refere a TEWL. No entanto, após 2 e 4 horas após a aplicação dos LF ocorre um maior decréscimo desse componente mensurado indicando que esses lipídeos são mais eficientes em recuperar a função de barreira da pele em comparação com os não fisiológicos. Tem-se sugerido que esse efeito progressivo se deva à alocação dos LF nas camadas nucleadas da epiderme, transporte para o aparelho de Golgi e incorporação nos corpos lamelares, propiciando a formação de unidades lamelares normais que são necessárias para a restauração da pele enquanto barreira (Figura 9) (MAO-QIANG; ELIAS; FEINGOLD, 1993; MAO-QIANG; BROWN; WU-PONG, 1995; LODÉN; BARANY, 2000).

Figura 9 - Diferença entre os prováveis efeitos da aplicação cutânea de lipídeos não fisiológicos e fisiológicos.



Fonte: Adaptado de GOLDSTEIN; ABRAMOVITS (2003).

A aplicação tópica de um ou dois dos três lipídeos essenciais para a pele tem se mostrado ineficiente em recuperar a pele, inclusive causando a inibição desse processo ou em um pior cenário, o agravamento dessa condição de barreira dérmica prejudicada. Tais resultados insatisfatórios se devem à formação de estruturas intercelulares anormais no EC (MAN; FEINGOLD; ELIAS, 1993). No mesmo sentido, De Paepe et al. (2000) observaram que, em peles humanas danificadas por lauril sulfato de sódio não foi observada aceleração do reparo de barreira após o tratamento com diferentes emulsões contendo como LF apenas ceramida 3B, de maneira que a

taxa de recuperação da pele é semelhante à encontrada com o uso de emulsões sem ceramida.

O efeito reparador da aplicação tópica de um LF parece depender do tipo de dano ao qual a pele foi submetida e ao lipídeo aplicado. Lintner e colaboradores (1997) verificaram que a aplicação de uma emulsão incorporada com ceramida sintética do tipo 2 proporcionou um efeito reparador em pele danificada por lauril sulfato de sódio e reforçador do efeito dessa barreira em pele danificada por *tape stripping*. Em estudo realizado por Byun e colaboradores (2012), a aplicação do colesterol sozinho foi capaz de proteger a pele dos danos causados pela radiação ultravioleta, especialmente em condições nas quais já ocorria um comprometimento da barreira cutânea. Por outro lado, misturas equimolares de lipídeos cutâneos, e ácidos graxos e ceramida isolados promoveram efeito contrário, ao agravar danos preexistentes.

Apesar desses resultados, às misturas completas das classes de LF tem sido atribuída, de modo mais consensual, a normalização da recuperação da função de barreira da pele, pela entrada desses lipídeos nas camadas nucleadas da epiderme, com consequente formação de unidades lamelares normais (MAN; FEINGOLD; ELIAS, 1993). Misturas equimolares de colesterol, ceramida e ácidos graxos (essenciais ou não) permitiram uma recuperação normal da pele. Essa taxa de recuperação pode ser, ainda, acelerada significativamente quando a proporção de uma das três espécies é aumentada, com uma recuperação otimizada ocorrendo quando ela é triplicada (MAO-QIANG; ELIAS; FEINGOLD, 1993; MAO-QIANG et al.; 1996a, 1996b). Apesar disso, novamente, a eficiência da formulação parece depender do agente causador da alteração no tecido cutâneo e com o tipo ou fonte do lipídeo dominante.

Chamlin e colaboradores (2002) verificaram que uma mistura de LF com ceramida dominante melhorou a dermatite atópica em crianças em estudo aberto, com redução clínica da severidade da doença e redução da TEWL. Nanopartículas patenteadas contendo ácido oleico, ácido palmítico, colesterol e, predominantemente, ceramida-3 (Locobase[®] *Repair*) em estudo realizado com 580 pacientes contendo dermatite atópica, dermatite por alergia de contato ou dermatite de contato irritante foram úteis em melhorar as propriedades de barreira, com redução de secura, descamação ou fissura, mesmo sem exercerem um efeito farmacológico (BERARDESCA et al., 2001). Em outros estudos clínicos em que Locobase[®] *Repair* foi comparada a uma formulação tradicional com petrolato no tratamento de eczema

ou da pele danificada por dodecil sulfato de sódio, não encontrou-se superioridade do emoliente com LF em relação à melhoria de prurido, eficácia, aceitação por parte do paciente bem como ao uso de corticoides tópicos e, estes foram inferiores à formulação controle em formar uma barreira física eficiente que protegesse a pele da exposição repetida ao tensoativo (KUCHAREKOVA et al., 2002; KUCHAREKOVA; KERKHOF; VALK, 2003). Huang e Chang (2008) demonstraram que a aplicação simultânea de ceramida 1 e 3 reduz a TEWL e aumenta a hidratação em peles irritadas por lauril sulfato de sódio pelo benéfico efeito sinérgico entre as moléculas nas propriedades bioquímicas da pele.

Nesse sentido, estudos demonstraram que o tratamento tópico com misturas com colesterol dominante acelerou a recuperação da pele danificada por *tape stripping* em ratos envelhecidos (ZETTERSTEN et al., 1997).

Emulsões ou nanoemulsões catiônicas compostas de ácido graxo, colesterol e ceramida 3 e 3B promoveram aumento da hidratação e elasticidade em peles saudáveis ou danificadas por acetona ou lauril sulfato de sódio. Tais resultados demonstram que a presença das três classes lipídicas em promover resultados clínicos uma vez que as formulações contendo apenas as ceramidas associadas não foram eficazes ou quando o foram, sua efetividade foi menor (DE PAEPE; ROSEEUW; ROGIERST, 2002; YILMAZ; BORCHERT, 2006).

Resultados, ainda, sugerem de modo bastante especial, que formulações com mistura completa de LF são potenciais no tratamento de diversas doenças cutâneas crônicas, tais como a psoríase, mesmo que nenhum estudo tenha sido feito utilizando essa doença em particular. Kim e colaboradores (2012) avaliaram a capacidade de micropartículas contendo ceramida, colesterol e ácido esteárico na recuperação das funções de barreira da pele de ratos sensibilizados com oxazolona, a qual induziu a inflamação cutânea crônica. Os resultados evidenciaram que as micropartículas são altamente eficazes em recuperar a função de barreira epidérmica em peles danificadas, promovendo uma redução da TEWL e da espessura da pele comparáveis com desonida 0,05%, amplamente utilizada em inflamações cutâneas. Ainda, estudos, realizados em ratos, sugerem que a aplicação tópica de uma mistura equimolar de LF normaliza tanto a homeostase quanto a integridade do EC, sendo, portanto, benéfica para condições dermatológicas em que ocorre alteração na permeabilidade cutânea, induzidas pelo estresse psicológico ou pelo uso, a curto prazo, tópico ou sistêmico de corticoides (KAO et al., 2003; CHOI et al., 2005).

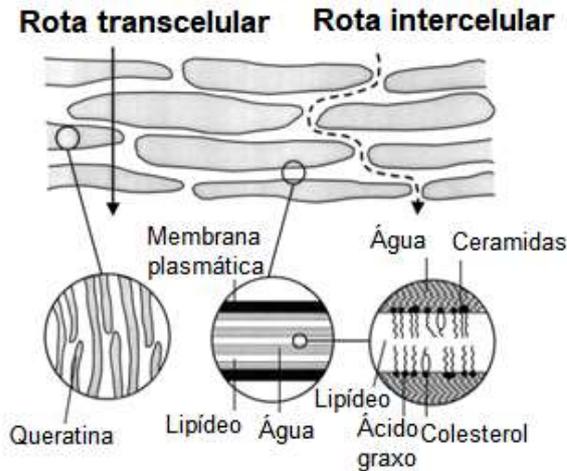
A utilização de LF combinada com a nanotecnologia tem oferecido possibilidades atrativas. Os efeitos benéficos de lipossomas contendo LF extraídos de tecidos queratinizados, como lã de merino, na pele intacta envelhecida ou seca tem sido reportada (CODERCH et al., 2002). Misturas LF estruturados como cristais líquidos lamelares proporcionam maior retenção de água pelo EC, o que possibilita melhor recuperação da função de barreira da pele danificada (IMOKAWA et al., 1989). Além disso, os lipídeos assim organizados possuem maior capacidade de penetrar a pele ou de facilitar a penetração cutânea de fármacos em comparação com emulsões convencionais (IWAI; FUKASAWA; SUZUKI, 1998; LEE et al., 2015).

2.7 PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

Apesar de a localização da barreira cutânea ter sido por muito tempo objeto de discussões, Christopher e Kligman (1964) demonstraram a resistência exercida pelo EC a partir de seu isolamento e, paralelamente, os estudos de Blank (1965) e Scheuplein e Blank (1971) evidenciaram as particularidades do EC, cuja penetração de substâncias é determinada por características químicas da molécula e espessura do EC. Nesse sentido, Andrews, Jeong e Prausnitz (2013) observaram que apesar de a remoção da epiderme inteira aumentar a permeabilidade da pele, a remoção do EC já é capaz de aumentar drasticamente esse parâmetro cutâneo. Esses estudos, portanto, evidenciam o importante papel do EC enquanto barreira.

A penetração de fármacos através da pele inclui sua difusão através da epiderme intacta e através dos apêndices cutâneos, como folículos pilosos e glândulas sebáceas, os quais fornecem uma via “alternativa” à epiderme intacta. Entretanto, como esses apêndices ocupam apenas 1% da superfície total da pele humana, a entrada de fármacos por essa rota é considerada muito pequena. Como a permeação de fármacos através da pele é limitada pelo EC, duas rotas podem ser identificadas: a rota lipídica intercelular entre os corneócitos e a rota transcelular através dos corneócitos (Figura 10) (ILLEL, 1997).

Figura 10 - Rotas para a penetração cutânea de fármacos.



Fonte: Adaptado de MOSER et al. (2001).

A escolha de fármacos candidatos à penetração cutânea deve ser baseada em fatores, como propriedades físico-químicas, interações do fármaco com a membrana cutânea e aspectos farmacocinéticos. As propriedades físico-químicas ideais são baixo peso molecular (abaixo de 500 Da), estado de ionização (a presença de cargas limita a penetração de fármacos), coeficiente de partição e solubilidade adequados (fármacos muito hidrofílicos são improváveis de particionar do veículo para o EC, enquanto que fármacos muito lipofílicos têm alta afinidade pelo EC e é improvável que atinjam outras camadas mais internas da pele) (WIECHERS, 1989; BENSON, 2012).

A difusão de compostos através da pele pode ser descrita, de modo simplificado, pela primeira Lei de Fick (HIGUCHI, 1960):

$$J = \frac{C_{s,m} D_m}{L} \times \frac{C_v}{C_{s,v}}$$

Onde D_m é o coeficiente de difusão, $C_{s,m}$ é a solubilidade do composto na membrana, L é o comprimento da membrana, C_v é a concentração do composto no veículo e $C_{s,v}$ é a solubilidade do composto no veículo.

De acordo com essa lei, três estratégias diferentes podem ser utilizadas para aumentar a penetração de fármacos na pele: o aumento do D_m , do $C_{s,v}$ e da razão entre o aumento da razão entre C_v e $C_{v,s}$ (MOSER et al., 2001).

Promotores de penetração cutânea podem aumentar o coeficiente de difusão do fármaco no EC (por exemplo, interrompendo de modo reversível a barreira naturalmente exercida pelo EC), aumentar a concentração de fármaco no veículo (agindo, por exemplo, como anti-solvente), melhorar o coeficiente de partição do

fármaco entre a formulação e o EC, ou ainda que de forma menos provável, diminuir a espessura da pele e assim, aumentarem a penetração de compostos na pele. (WILLIAMS; BARRY, 2012; LANE, 2013).

A fim de reduzir temporária e reversivelmente a função de barreira do EC, diversas estratégias têm sido desenvolvidas. Métodos físicos, químicos, a combinação de ambos ou ainda a utilização de sistemas resultam em uma melhor penetração de substâncias através da pele proporcionando concentrações adequadas para o tratamento tópico ou transdérmico (AL-AHMADY; SCUDAMORE; KOSTARELOS, 2015; AZAGURY et al., 2015; TAKEUCHI et al., 2017; ATEF; ALTUWAJRI, 2018).

3 OBJETIVOS

3.3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver fases lamelares associadas a lipídeos fisiológicos e metotrexato para potencial tratamento tópico da psoríase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o comportamento de fases de diferentes tensoativos e fases oleosas na formação de sistemas líquido cristalinos lamelares.
- b) Incorporar metotrexato nas fases lamelares selecionadas.
- c) Selecionar fases lamelares com características sensoriais e viscosidade adequadas à aplicação cutânea.
- d) Avaliar o efeito promotor das fases lamelares contendo lipídeos fisiológicos na penetração cutânea de substâncias hidrofílicas fluorescentes por microscopia confocal de varredura a laser.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes

Ácido esteárico Sigma Aldrich® (Petaling Jaya, Selangor, Malásia);

Ácido oleico Synth® (Diadema, São Paulo, Brasil);

Ácido (orto) fosfórico 85% P. A. Proquimios® (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil);

Álcool cetílico 20etoxilado e 5 propoxilado, Procetyl® AWS, Croda® (Campinas, São Paulo, Brasil);

Ceramida 3 Galena® (Campinas, São Paulo, Brasil);

Cloreto de sódio P. A. Synth (Diadema, São Paulo, Brasil);

Colesterol Sigma Aldrich® (Tokyo, Honshu, Japão);

Dietilenoglicol monoetil éter Sigma Aldrich® (Tóquio, Honshu, Japão);

Etilenodiamina tetrakis (propoxilado etoxilado) tetrol, Tetronic® 701, Sigma Aldrich® (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos);

Fosfato dissódico anidro P. A. Proquimios® (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil);

Fosfato monossódico anidro P. A. Proquimios® (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil);

Hidróxido de sódio (lentilhas) P. A. Vetec® (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil);

Metotrexato Fagron® (Copenhage, Hovedstaden, Dinamarca);

Polioxietileno 10 cetil éter, Brij® C10, Sigma Aldrich® (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos);

Polioxietileno 2 oleil éter, Brij® 93, Sigma Aldrich® (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos);

Sulforodamina B Sigma Aldrich® (China).

4.1.2 Equipamentos

Analisador de textura TATX Plus *Stable Micro Systems*®;

Balança analítica Schimadzu® modelo AUY 220;

Banho Maria Hemoquímica®;
Banho ultrassom Unique®;
Bomba de vácuo Solab® modelo SL 61;
Célula de difusão vertical Hanson Research®;
Medidor de pH MS Tecnopon Instrumentação® modelo mPA-210;
Microscópio Confocal de Varredura a Laser C2 Plus Nikon®;
Microscópio de luz polarizada Axio Scope® A2;
Reômetro Haake MARS® II;
Sistema Millipore® para purificação de água (Milli Q Plus).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Construção dos diagramas de fases

O estudo do comportamento de fases foi investigado pela construção de quatro diferentes diagramas de fases ternários, fixando-se em todos ácido esteárico como fase oleosa e água purificada como fase aquosa. Foram utilizados quatro diferentes tensoativos, polioxietileno 2 cetil éter OLETH-2 (Brij® 93); polioxietileno 10 cetil éter, CETETH-10 (Brij® C10); álcool cetílico 20 etoxilado e 5 propoxilado, PPG-5-CETETH-20 (Procetyl® AWS) e etilenodiamina tetrakis (propoxilado etoxilado) tetrol (Tetronic® 701, que foi denominado nesse trabalho como T 701). Para a obtenção dos diagramas de fases foram preparados pontos internos variando as proporções de 5 a 95 % de cada componente, a saber fase oleosa, fase aquosa e tensoativo.

As misturas de tensoativo e fase oleosa, em diferentes proporções, foram aquecidas em banho-maria até 75°C, temperatura suficiente para fusão dos componentes sólidos e semissólidos, e a seguir adicionou-se água na mesma temperatura. Os sistemas foram então homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro.

As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. Os sistemas foram mantidos em repouso por 7 dias e, em caso de formação de bolhas, o tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas.

Após esse período de equilíbrio, todos os sistemas foram classificados visualmente, procurando identificar os sistemas viscosos e transparentes, indicativos

d formação de cristais líquidos. Foi adotada a seguinte classificação: sistemas altamente viscosos transparentes (STAV), sistemas viscosos transparentes (SVT), sistemas opacos (SO) e separação de fases (SF). Desse modo, foi possível delimitar as diversas regiões nos diagramas de fases.

Para a construção do diagrama de fases ternário foi calculado o percentual (p/p) de cada componente, e plotado utilizando o software Sigma Plot[®], versão 10.0 (*Systat Software*, EUA).

4.2.2 Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP)

Após a classificação visual, STAV e STV foram analisados por MLP. Para isso, as amostras A caracterização por MLP foi realizada utilizando um microscópio de luz polarizada Axio Scope[®] A2, da Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas. As amostras foram preparadas colocando uma alíquota dos sistemas selecionados sobre uma lâmina, a qual foi coberta com lamínula e, em seguida, analisadas com auxílio de microscópio de luz polarizada. As imagens foram obtidas num aumento de 50.000 x.

Através desta técnica foi possível classificar os sistemas quanto à isotropia e anisotropia. Sobre um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica quando não for capaz de o fazer. Fases lamelares e hexagonais são anisotrópicos e sua organização estrutural resulta em campos de visualização característicos, como as cruces de Malta, mosaico ou espiral no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal. Já a fase cúbica, sistema micelar, microemulsão e emulsão são isotrópicos e observa-se, apenas, um campo escuro (GOODBY et al., 1998; MCGRAFTH; KLÉMAN, 1993; HYDE, 2001).

4.2.3 Avaliação do comportamento de fases com associação de ácido oleico

Sistemas contendo ácido esteárico como fase oleosa e classificados como STAV foram selecionados para avaliação do comportamento de fases com associação de ácido oleico. O ácido oleico foi adicionado em proporções 1:1; 1,5:1; 7:3 e 4:1 (p/p) em relação ao ácido esteárico. Os sistemas foram preparados pelo aquecimento da fase oleosa mais tensoativo, seguido da adição de água, ambas as fases à 75°C, e então homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro.

As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. Os sistemas resultantes foram mantidos em repouso por 7 dias e, em caso de formação de bolhas, o tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas. Após esse período de equilíbrio, todos os sistemas foram classificados visualmente em STV, STAV, SO e SF. Os sistemas classificados como STV e STAV foram então analisados por MLP.

4.2.4 Avaliação do comportamento de fases com associação de dietilenoglicol monoetil éter

STAV foram selecionados para avaliação do comportamento de fases com associação do cotensoativo dietilenoglicol monoetil éter, o qual foi adicionado em concentrações crescentes, não ultrapassando 10% em relação a composição inicial dos sistemas.

Os sistemas foram preparados pelo aquecimento da fase oleosa mais tensoativo, seguido da adição de água, ambas as fases à 75 °C (conforme item 4.2.1) e cotensoativo não aquecido, e homogeneizados com um bastão de vidro.

As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. Os sistemas resultantes foram mantidos em repouso por 7 dias e, em caso de formação de bolhas, o tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas. Após esse período de equilíbrio, todos os sistemas foram classificados visualmente em STV, STAV, SO e SF. Os sistemas classificados como STV e STAV foram então analisados por MLP.

4.2.5 Avaliação do comportamento de fases com associação de colesterol

Sistemas contendo ácido esteárico como fase oleosa e classificados como STAV foram selecionados para avaliação do comportamento de fases com associação de colesterol. O colesterol foi adicionado na proporção de 3:7 (p/p) em relação ao ácido esteárico. Os sistemas foram preparados pelo aquecimento da fase oleosa mais tensoativo, seguido da adição de água, ambas as fases à 75°C, e então homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro.

As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. Os sistemas

resultantes foram mantidos em repouso por 7 dias e, em caso de formação de bolhas, o tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas. Após esse período de equilíbrio, todos os sistemas foram classificados visualmente em STV, STAV, SO e SF. Os sistemas classificados como STV e STAV foram então analisados por MLP.

4.2.6 Avaliação do comportamento de fases com associação de ceramida 3

Sistemas contendo ácido esteárico e ácido esteárico/colesterol como fase oleosa e classificados como STAV foram selecionados para avaliação do comportamento de fases com associação de ceramida 3. A ceramida foi adicionada na proporção 1:9 em relação à fase oleosa original. Os sistemas foram preparados pelo aquecimento da fase oleosa mais tensoativo, seguido da adição de água, ambas as fases à 75°C, e então homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro.

As formulações foram preparadas em frascos transparentes e após seu resfriamento os recipientes foram tampados com tampas de borracha. Os sistemas resultantes foram mantidos em repouso por 7 dias e, em caso de formação de bolhas, o tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas. Após esse período de equilíbrio, todos os sistemas foram classificados visualmente em STV, STAV, SO e SF. Os sistemas classificados como STV e STAV foram então analisados por MLP.

4.2.7 Teste de incorporação do metotrexato e determinação de pH dos sistemas

Formulações com concentrações finais de 1% de MTX foram preparadas conforme descrito nos itens 4.2.1 e 4.2.4 a 4.2.6 sendo o fármaco incorporado em substituição à fase aquosa constituída apenas por água. Essa concentração foi selecionada devido ao fato de a maior quantidade de MTX solubilizada na fase aquosa, encontrada experimentalmente, ser de 50 mg/mL.

A partir de uma solução de MTX (50 mg/mL em NaOH 1M, pH 8) aquecida, alíquotas com volume correspondente à quantidade necessária de MTX foram adicionadas à mistura de tensoativo e fase oleosa. Caso a alíquota de solução fosse insuficiente para atingir o volume de fase aquosa da formulação, esse volume foi completado com solução NaOH 1M, pH 8, sem o fármaco, também aquecida.

Após 7 dias de estabilização dos sistemas, realizou-se a medida do pH dos sistemas selecionados. A medida de pH foi realizada em um medidor de pH MS

Tecnopon Instrumentação® utilizando-se amostras incorporadas com MTX diluídas em água destilada (5%). O peagâmetro utilizado foi previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,4, a uma temperatura de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

As formulações incorporadas com MTX foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foram analisadas macroscopicamente quanto a possíveis modificações e precipitação do fármaco, por um período de seis meses.

4.2.8 Análise do perfil de textura – TPA

A análise do perfil de textura foi realizada utilizando um analisador de textura TATX Plus (*Stable Micro Systems*®) no modo TPA (*Texture Profile Analysis*).

As amostras selecionadas foram pesadas (8g de cada uma) em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD®), mantidas em repouso até que fossem eliminadas bolhas de ar e a superfície foi mantida lisa com auxílio de uma espátula.

O ensaio foi realizado com as formulações testadas para a incorporação do MTX, porém sem a adição do fármaco.

No modo TPA a prova analítica de 10 mm de diâmetro desceu a uma velocidade constante de 1 mm/s até atingir a amostra. O contato foi detectado com uma trigger force de 0,002 N e então a prova analítica entrou na amostra a uma profundidade de 10 mm e voltou até a superfície a uma velocidade de 0,5 mm/s. Após esse ciclo, a prova permaneceu em repouso por 5 s e iniciou-se um segundo ciclo de compressão. As amostras foram analisadas em triplicata à temperatura ambiente.

Durante os dois ciclos de compressão, o software *Texture Exponent Lite* do equipamento plotou uma curva força versus tempo através da qual obtêm-se características mecânicas de textura da amostra como compressibilidade, adesividade e coesão.

4.2.9 Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

A força bioadesiva das formulações foi avaliada através da medição da força necessária para remover a formulação estudada mantida em contato com peles de orelhas de porco dermatomizadas, utilizando um analisador de textura TATX Plus (*Stable Micro Systems*®) no modo *Adhesion Test*.

Para a realização do teste, as mesmas formulações selecionadas para análise do perfil de textura foram acondicionadas em frascos plásticos cilíndricos rasos e, com auxílio de uma espátula, a superfície de cada formulação foi mantida lisa. Essa amostra da formulação foi então colocada sob a prova analítica contendo o modelo de pele animal utilizado nesse trabalho o qual foi fixado na sonda cilíndrica do equipamento com um anel de borracha de modo a manter a epiderme voltada para o meio externo.

A fim de garantir o contato com a amostra, a pele foi introduzida a 1mm de profundidade a partir da superfície da amostra e mantida por 5 s sem a aplicação de nenhuma força durante o contato. O contato entre amostra e a pele foi detectada por uma *trigger force* de 0,002 N para formulações menos viscosas e de 0,1 N para formulações altamente viscosas. A seguir, a prova foi removida a uma velocidade constante de 0,5mm/s até que não houvesse contato entre ambas as superfícies.

O software *Texture Exponent Lite* do equipamento registrou a força necessária para a remoção, obtendo-se então um gráfico de força versus tempo. A partir desse gráfico, o software então calculou a área obtida durante a fase de destaque da amostra e pele, denominada trabalho de bioadesão. Determinou-se também o pico de bioadesão, que representa a força máxima durante a retirada da amostra. As amostras foram analisadas em triplicata à temperatura ambiente.

4.2.10 Análise reológica oscilatória

A análise reológica oscilatória foi realizada na Universidade Estadual de Maringá (UEM), utilizando um reômetro Haake MARS II, no modo oscilatório, a 25 ± 0.1 °C, com geometria cone-placa paralelas de 35 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm.

A Região Viscoelástica Linear (RVL) foi inicialmente investigada pelo aumento da tensão oscilatória (torque *sweep*) a uma frequência fixa para cada amostra. Essa região é caracterizada como a região onde a tensão e a deformação são diretamente proporcionais e o módulo de armazenamento, ou elástico (G'), permanece constante (LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2002; KABOORANI; BLANCHET, 2014).

Após a determinação da tensão da região viscoelástica de cada sistema, realizou-se o teste de varredura de frequência, nessa região, para a determinação do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'').

As amostras foram cuidadosamente aplicadas na placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 1 minuto antes de cada determinação. Um intervalo de frequência de 0,1 a 10,0 Hz, foi analisado para cada amostra. O módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') foram determinados utilizando o programa *RheoWin* 4.10.0000 (Haake®).

4.2.11 Avaliação do efeito promotor *in vitro* de mesofases lamelares associadas a lipídeos fisiológicos

Um estudo de penetração cutânea *in vitro* de sulforodamina B, um marcador fluorescente modelo de fármacos hidrofílicos (KÜCHLER et al., 2009), foi realizado a fim de avaliar o efeito promotor de mesofases lamelares adequadas para a aplicação tópica e para presumir sua distribuição no substrato cutâneo.

O modelo de pele utilizado foi a pele de orelhas de porcos saudáveis provenientes do Frigorífico Olhos d'Água (Ipeuna - SP) logo após o abate rotineiro de animais para o consumo. As orelhas recebidas foram lavadas e vasos sanguíneos, gordura, tecidos e pelos em excesso foram removidos com auxílio de uma tesoura e, em seguida, dissecadas com auxílio de pinça e bisturi. As peles dissecadas foram dermatomizadas com auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500 μm para se obter uma camada fina e uniforme. As peles então foram armazenadas a -20°C e, antes da realização desse estudo, foram mantidas em temperatura ambiente e pelos ainda restantes foram retirados com auxílio de uma tesoura.

No dia do experimento, a pele descongelada foi montada em célula de difusão do tipo Franz Hanson Research®, com área de difusão de 1,77 cm^2 com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor. O compartimento receptor foi preenchido com solução tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 e mantido a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante (300 rpm). Formulações líquido cristalinas lamelares testes e controle contendo sulforodamina B na concentração de 0,02% foram aplicadas no compartimento doador.

Em intervalos de tempo pré-determinados (1, 6 e 12 horas) as formulações e controle foram removidos da pele assim como o excesso do corante, com auxílio de papel filtro, para evitar a contaminação pelo marcador fluorescente. A seguir, as amostras de pele foram preparadas colocando-as sobre uma lâmina e coberta com

lamínula. As amostras de pele foram então examinadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser C2 Plus Nikon®; utilizando lentes objetivas de 20x a fim de observar a distribuição da sulforodamina B nas camadas da pele. A fluorescência foi recuperada na faixa do vermelho com excitação de 561 nm.

4.2.12 Análise estatística

Os resultados obtidos pelas caracterizações físico-químicas foram apresentados pelas médias e desvios-padrões. A comparação entre as médias dos resultados e valores encontrados na literatura foi determinada por teste t uma amostra. A comparação entre as médias dos resultados foi determinada por análise de variância ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

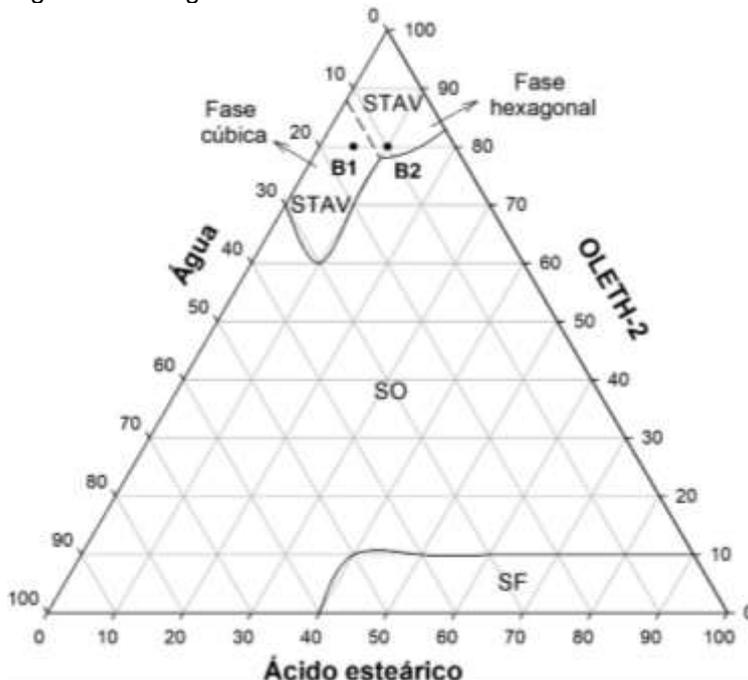
5.1 CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS TERNÁRIOS DE FASES

A construção de diagramas de fases se mostra como um importante ponto de partida para o delineamento de diferentes fases formadas por tensoativos, fase oleosa e fase aquosa, demonstrando assim, propriedades físicas essenciais para o desenvolvimento da formulação farmacêutica mais adequada, uma vez que explana a proporção necessária de cada componente para a formação dos diferentes agregados (LAWRENCE; RESS, 2000; FEIGENSON; BUBOLTZ, 2001).

Nesse trabalho, foram construídos quatro diagramas, a fim de entender como quatro diferentes tensoativos: OLETH-2, CETETH-10, PPG-5-CETETH-20, T 701, se comportaram na presença de ácido esteárico (AE) e água.

Assim sendo, primeiramente foi construído o Diagrama 1 obtido pela mistura de OLETH-2, AE e água conforme observa-se na Figura 11.

Figura 11 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de OLETH-2, ácido esteárico e água.



Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas opacos (SO); Separação de fases (SF); (B1) e (B2) Amostras caracterizadas.

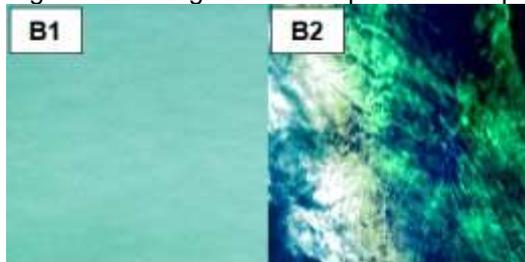
Este diagrama mostra que em sua maior parte foram formados sistemas termodinamicamente instáveis (SF e SO). SF ocorreram apenas uma região estreita

acima de 40% de fase oleosa, acima de 90% de fase aquosa e abaixo de 10% de tensoativo. A região mais extensa do diagrama foi representada por SO, os quais foram formados em toda a extensão de fase oleosa, fase aquosa igual ou superior a 30% e tensoativo entre 10 e 85%. Acredita-se que pelo fato de o OLETH-2 ser ligeiramente solúvel em água devido à sua hidrofobicidade ($EHL = 4$) uma extensa concentração de AE pode ser estabilizada pelo tensoativo e, conseqüentemente uma grande taxa de SO foi encontrada nesse diagrama (PALLA; SHAH, 2002; KONG; BHOSALE; ZIEGLER, 2018).

STAV foram formados em uma pequena região do diagrama, sendo formados em concentrações inferiores a 20 % de AE, iguais ou inferiores a 30% de água e iguais ou superiores a 60% de OLETH-2.

Quando se fixou a quantidade de tensoativo em 80%, o aumento de 5 para 10% de AE fez os sistemas passarem da fase cúbica (B1), identificada pela observação de imagens isotrópicas na MLP, para fase cúbica (B2), constatada pela presença de estrias na MLP (Figura 12). Pode ser sugerido que, nesse sistema, o aumento de AE promove alongamento das micelas antes fortemente empacotadas.

Figura 12 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas B1 e B2.



Fonte: Da autora.

Uma característica importante dos STAV obtidos com as misturas ternárias de OLETH-2, AE e água é que após determinado tempo os STAV tenderam a formar um sistema bifásico. A fase superior foi formada pelo STAV que pode ser caracterizado como fase hexagonal ou cúbica pela MLP, enquanto a inferior era composta por SO, que possuía aspecto visual de uma emulsão convencional. Essas fases ao serem misturadas davam origem a um sistema rígido e esbranquiçado que após algum tempo, voltava a separar-se.

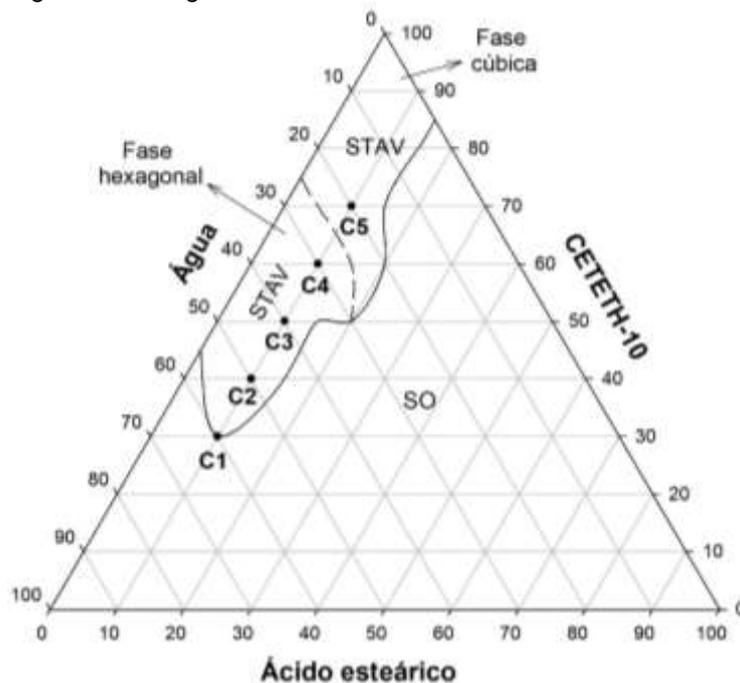
Sharar et al. (2017) ao construírem diagramas contendo OLETH-2 como tensoativo, água como fase aquosa e óleo essencial de laranja ou de cânfora como fase oleosa, para uso na agricultura, também reportaram a capacidade desse

tensoativo em formar sistemas compostos por duas fases, sendo uma delas cristal líquido.

Portanto, devido a essa instabilidade, não se prosseguiu com as caracterizações de amostras deste diagrama.

O Diagrama 2, ilustrado na Figura 13, foi obtido pela mistura de CETETH-10, AE e água.

Figura 13 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de CETETH-10, ácido esteárico e água.



Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas opacos (SO); (C1), (C2), (C3), (C4) e (C5) Amostras caracterizadas.

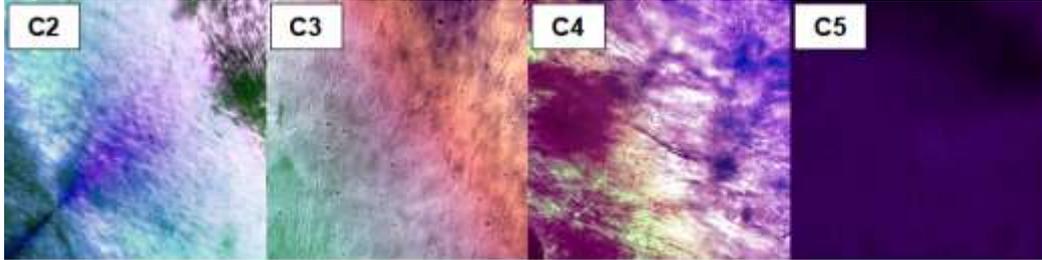
Este diagrama mostra que foram formados apenas dois tipos de sistemas, os SO e STAV. Os SO foram formados na maior parte do diagrama, em todas as concentrações de fase oleosa, em quase toda concentração de fase aquosa fase aquosa e até 85% de tensoativo.

Sistemas classificados como STAV foram formados com concentrações de tensoativo acima de 30% em uma região encontrada na parte esquerda do diagrama, formada em concentrações inferiores a 20 % de ácido esteárico, inferiores a 60% de água e acima de 30% de CETETH-10.

Quando se fixa a quantidade de AE em 10%, o aumento de 30% para 40% de tensoativo fez os sistemas que eram opacos (C1) mudassem para STAV. As micelas empacotaram-se de modo que as micelas passaram a assumir uma forma mais

alongada, formando, portanto, fases hexagonais (C2 a C4), como indicado pela textura em forma de fibras na Figura 14. Com o aumento da quantidade de tensoativo de 60% para 70%, o sistema se tornou ainda mais empacotado resultando em fase cúbica (C5), já que a MLP mostrou imagens isotrópicas (Figura 14).

Figura 14 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C2, C3, C4 e C5.



Fonte: Da autora.

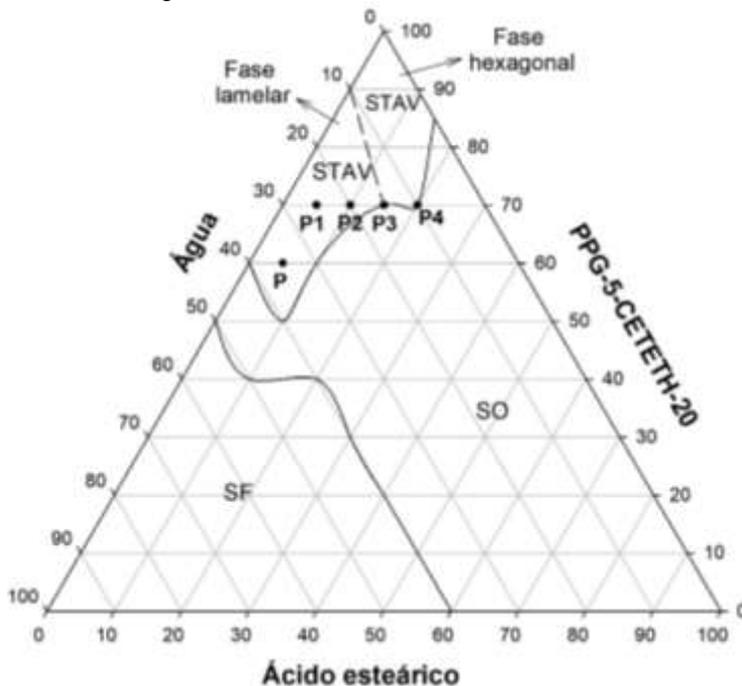
Coleman e Attard (2001) demonstraram que a mistura binária de CETETH-10 e água resulta em estruturas líquidos cristalinas do tipo cúbica, hexagonal e lamelar. Entretanto, assim como verificado no presente estudo, a adição de um terceiro componente frequentemente provoca mudanças no comportamento de fases nessa mistura de água e tensoativo. A adição de um macrômero PLA-PEG-PLA (PEG = polietilenoglicol; PLA = ácido poliático), composto altamente hidrofílico, por exemplo, inibe a formação de fases cúbicas e hexagonais, proporcionando apenas a mesofase lamelar em concentrações superiores a 35% de tensoativo (CLAPPER; IVERSON; GUYMON, 2007).

Sendo assim, o diagrama de CETETH-10, AE e água aqui desenvolvido também sustenta a ideia de que o comportamento da mistura binária é bastante influenciado pela adição de um terceiro componente e que esta influência possivelmente se deva às características de solubilidade da molécula adicionada, uma vez que a adição de um componente lipofílico, como o AE, favoreceu a formação de fases cúbicas e hexagonais, além de SO.

Portanto, misturas de CETETH-10, AE e água podem resultar em sistemas líquido cristalinos do tipo hexagonal e cúbico, empregando concentrações de fase aquosa superiores a 25% para aquele e inferiores a essa quantidade para este.

O Diagrama 3, obtido pela mistura de PPG-5-CETETH-20, AE e água, está ilustrado na Figura 15.

Figura 15 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido esteárico e água.



Fonte: Da autora.

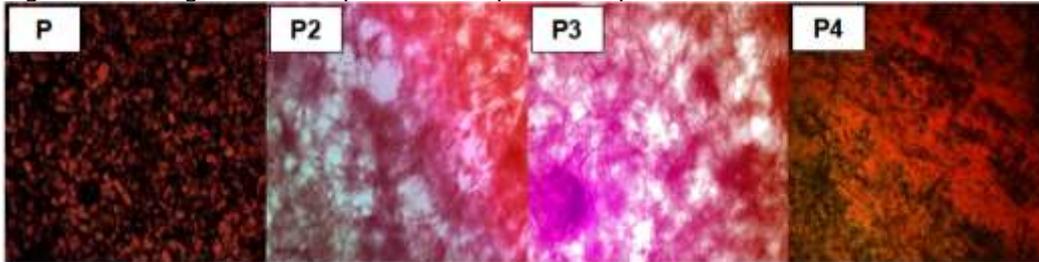
Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Separação de fases (SF); Sistemas opacos (SO); (P), (P1), (P2), (P3) e (P4) Amostras caracterizadas.

Este diagrama mostra uma grande tendência em formar SF e SO. SF foram formados na parte esquerda e inferior do diagrama, na concentração inferior a 60% de fase oleosa, superior a 50% de fase aquosa e inferior a 50% de tensoativo. Os SO, por sua vez, foram formados à direita do diagrama, em concentrações superiores a 60% de fase oleosa, inferiores a 50% de fase aquosa e de no máximo 80% de tensoativo.

A região de STAV foi formada no vértice superior do diagrama em concentrações abaixo de 20% de AE, abaixo de 40% de água e de no mínimo 70% de PPG-5-CETETH-20.

As fases lamelares (P e P2), identificadas por cruzes de Malta e mosaico (Figura 16), foram formadas em concentrações de AE menores ou iguais a 10%, tensoativo entre 60 e 80% e água entre 15 e 35%. Acima dessa concentração de AE houve um fechamento do filme interfacial anteriormente aberto, com a formação de micelas alongadas, o que caracteriza uma transição de fase lamelar para hexagonal (P3), que passa a ser dominante (P4) com aumento sucessivo de AE até 20%. Acima dessa concentração, o AE não pode ser mais estabilizado pelo sistema mantendo sua estabilidade termodinâmica, favorecendo, portanto, a formação de SO (Figura 16).

Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas P, P2, P3 e P4.



Fonte: Da autora.

Em relação à região composta por fases lamelares nota-se a existência de dois diferentes tipos de texturas observadas na MLP, as quais merecem ser mais detalhadas pois podem indicar diferentes interações na formação de cada fase lamelar. Geralmente as fases lamelares são caracterizadas por cruces de Malta e textura semelhante à mosaico (GOODBY et al., 1998; HYDE, 2001). Texturas típicas de mosaico foram observadas na parte esquerda da região composta por fase lamelar, ou seja, em menores concentrações de fase oleosa. Por outro lado, em sistemas contendo quantidades maiores de fase oleosa, ou seja, à direita na região composta por fase lamelar, cruces de Malta foram observadas. De modo curioso, os sistemas em que se observou a textura de mosaico eram mais transparentes e menos viscosos em comparação com os sistemas nos quais observou-se a presença de cruces de Malta, correspondendo a diferentes concentrações de AE.

Sendo assim, a diminuição da relação água/óleo em concentrações de tensoativo maiores que 70% promove o maior empacotamento dos sistemas com a mudança de sistemas lamelares para hexagonais. Este comportamento também foi observado no diagrama do CETETH-10, em que a diminuição de água promove um maior empacotamento dos sistemas.

Fixando-se a concentração de ácido esteárico em 10%, o aumento de 10% para 20% de água fez com que os sistemas hexagonais passassem a serem fases lamelares. O aumento da concentração de água de 40 para 50%, favoreceu a formação de SO a partir de fases lamelares. Consequentes aumentos no componente aquoso, já não puderam mais ser contidos no sistema sem que houve SF.

Carvalho (2012) demonstrou que a mistura binária de PPG-5-CETETH-20 e água resulta em estruturas líquido cristalinas do tipo hexagonal e cúbica, além de microemulsões. Entretanto, assim como verificado no presente estudo, a adição de um terceiro componente frequentemente provoca mudanças no comportamento de fases nessa mistura de água e tensoativo. A adição de ácido oleico, por exemplo, inibe

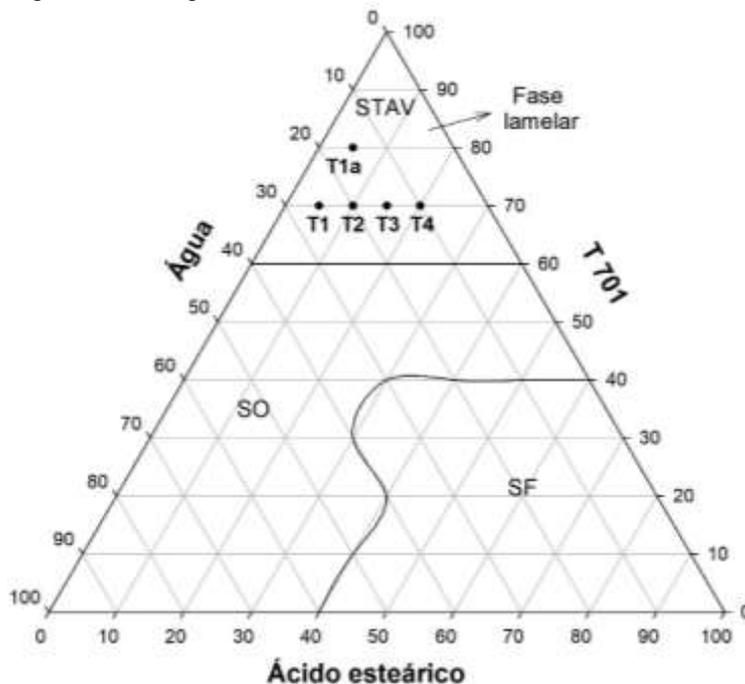
a formação de estruturas rígidas como a fase cúbica, possivelmente por agir como cotensoativo mesmo sendo altamente lipofílico (CARVALHO et al., 2013).

O diagrama de PPG-5-CETETH-20, AE e água aqui desenvolvido sugere, mais uma vez, que o comportamento da mistura binária é bastante influenciado pela adição de um terceiro componente, uma vez que a adição de um componente lipofílico que parece não agir como cotensoativo, como o AE, apesar de favorecer a formação de fases lamelares também favoreceu a formação de fases hexagonais (em maior extensão em comparação com diagrama contendo ácido oleico) e inibiu a formação de sistemas líquidos isotrópicos, representados por microemulsões, formados no diagrama de CARVALHO e colaboradores (2013).

Desse modo, misturas de PPG-5-CETETH-20, AE e água podem resultar em sistemas líquido cristalinos do tipo hexagonal e lamelar, empregando concentrações AE superiores a 15% de ácido esteárico para aqueles e inferiores a essa quantidade para estes.

A Figura 17 ilustra o Diagrama 4, obtido pela mistura de T 701, AE e água.

Figura 17 - Diagrama de fases ternário obtido com a mistura de T 701, ácido esteárico e água.



Fonte: Da autora.

(STAV) Sistemas transparentes altamente viscosos; Separação de fases (SF); Sistemas opacos (SO); (T1); (T1a), (T2), (T3) e (T4) Amostras caracterizadas.

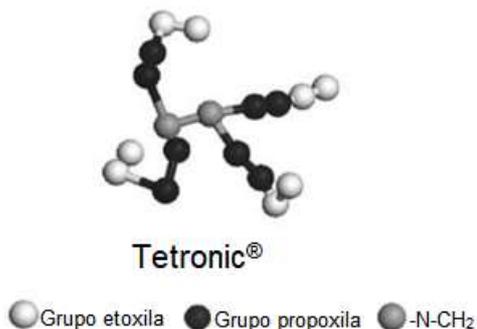
Observa-se que a maior parte do diagrama é formada por SO e SF. Houve uma considerável região com SF, formada com concentrações de fase oleosa superior a

40%, fase aquosa abaixo de 60% e tensoativo de até 40%. Próxima à região de SF, ocorreu uma extensa região de SO em todas as concentrações de fase oleosa, fase aquosa superior a 40% e tensoativo em concentração de no mínimo 60%.

A região classificada como STAV foi formada no vértice superior, com quaisquer concentrações de AE e água, sendo apenas imprescindível uma concentração de T701 superior a 60%. Nota-se que essa região de formação de STAV se assemelha à região de obtenção desse tipo de sistema no diagrama anteriormente construído, formado pelo tensoativo PG-5-CETETH-20. Isso demonstra certa similaridade nas concentrações de diferentes tensoativos etoxilados e propoxilados necessárias para a formação de STAV.

Dado que o EHL do T 701 ser baixo (EHL entre 1-7) esperava-se uma maior estabilização de sistemas com grande concentração de fase oleosa uma vez que a literatura relata que copolímeros com baixo EHL têm a capacidade de aumentar a estabilidade termodinâmica de micelas devido às fortes interações hidrofóbicas (LEE et al., 2011; SALAMA; SHAMMA, 2015). Entretanto, nesse diagrama apenas uma estabilização parcial ocorreu. Pode ser sugerido que, nesse diagrama, a conformação molecular do tensoativo (Figura 18) não favoreceu a formação de sistema termodinamicamente estáveis.

Figura 18 - Configuração molecular simplificada da molécula de Tetronic®.

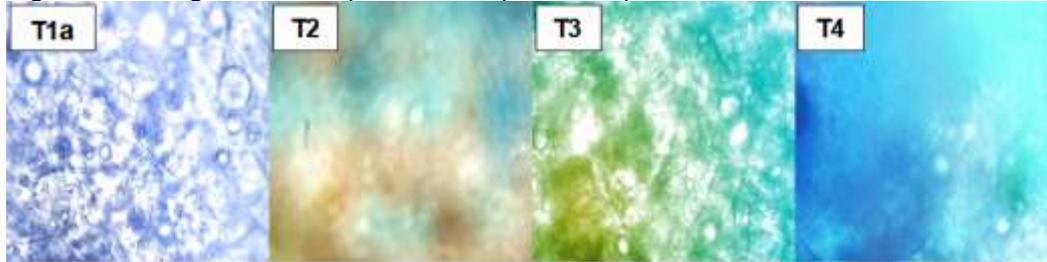


Fonte: Adaptado de WU et al. (2005).

A região composta por STAV era composta apenas por fases lamelares (T1a a T4), identificadas por cruces de Malta e vesículas visualizadas na MLP (Figura 19) e visualmente menos viscosas dentre as fases lamelares obtidas nos diagramas anteriores. As fases lamelares foram formadas quando a quantidade de água de SO foi reduzida de modo que o filme interfacial se abriu, propiciando uma situação em que

a água e o AE encontraram-se separados por uma dupla camada de tensoativo, formando, portanto, a fase lamelar.

Figura 19 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas T1a, T2, T3 e T4.



Fonte: Da autora.

Dois diferentes tipos de texturas foram observados na MLP, apesar de nesse diagrama apenas tenham sido formados sistemas líquido cristalinos do tipo lamelar e novamente, assim como discutido no diagrama anterior, essas diferentes texturas merecem ser mencionadas mais detalhadamente pois podem indicar diferentes interações na formação de cada fase lamelar. Geralmente as fases lamelares são caracterizadas por cruces de Malta e textura semelhante a mosaico (GOODBY et al., 1998; HYDE, 2001). Considerando as amostras produzidas neste trabalho, cruces de Malta típicas dessa mesofase foram observadas em sistemas à direita na região de STAV, ou seja, em fases lamelares com maiores concentrações de fase oleosa. Por sua vez, em sistemas com menores concentrações de fase oleosa, ou seja, à esquerda dessa região, notou-se na MLP a presença de estruturas em espirais, as quais são menos usuais, mas também foram relatadas por Eccleston e colaboradores (2000) e Savic e colaboradores (2011), tendo estes referido a essas estruturas como anéis de cebola. Apesar de duas texturas também terem sido observadas no diagrama anterior, diferentemente daquele, neste diagrama não havia diferença no aspecto visual de sistemas com diferentes texturas caracterizadas na MLP.

Fixando-se a concentração de AE em 30%, o aumento de 40% para 50% de água fez com que os sistemas lamelares perdessem a estabilidade termodinâmica e passassem a ser SO. Concentrações maiores de água, porém, não puderam ser mais estabilizadas pelo sistema de modo que se observou a SF.

Desse modo, misturas de T 701, AE e água podem resultar em sistemas líquido cristalinos do tipo lamelar, empregando concentrações de tensoativo superiores a 60%.

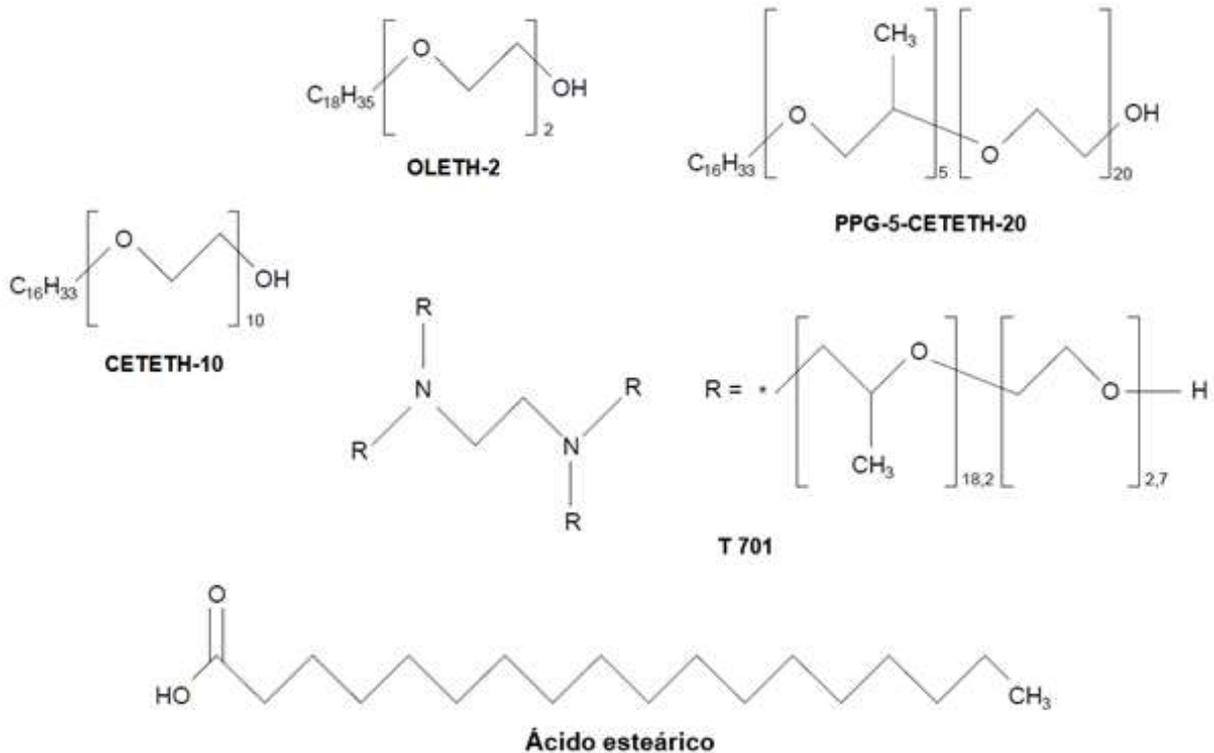
O ácido esteárico (Figura 20) é formado por uma cadeia carbônica saturada de 18 carbonos e um grupamento carboxílico terminal. Sua longa cadeia acila e ausência de insaturação tornam a molécula pouco hidrossolúvel (EHL = 15) (SEVERINO et al., 2011). Devido ao fato de ser saturado também, provavelmente suas moléculas se encontrem totalmente estendidas e se agrupem de modo bastante compacto (ROACH et al., 2004), o que reduz a formação de estruturas mais flexíveis e exerce grande influência no comportamento de fases nos diagramas. Essa teoria vai ao encontro da capacidade de ácidos graxos de cadeia com comprimento próximo ao AE em induzir a formação de mesofases mais compactadas, como fases hexagonais e cúbicas, já reportada pela literatura (KOYNOVA et al., 1988; HEIMBURG et al., 1990), e que também foi encontrada neste trabalho sobretudo com a utilização de CETETH-10.

Além disso, o fato de o tensoativo CETETH-10 (Figura 20) possuir 10 unidades de óxido de etileno também favorece a formação das mesofases encontradas. Este resultado vai ao encontro com a teoria do fator de empacotamento que relaciona a probabilidade de tensoativos a formarem determinados arranjos de acordo com a geometria da molécula. Para um dado tensoativo etoxilado, um maior número de unidades de óxido de etileno parece favorecer a formação de estruturas cilíndricas ou esféricas por aumentarem a área da cabeça polar e, conseqüentemente, reduzirem o valor de PEC (ESUMI; UENO, 2003).

Por outro lado, a formação de sistemas com menor grau de empacotamento, tais como a fase lamelar, só foi possível com a presença de tensoativos propoxilado e etoxilados (Figura 20) (PPG-5-CETETH-20 e T 701). O mecanismo de formação de fases lamelares a partir desse grupo de tensoativos provavelmente se deva à ocorrência de ligações de hidrogênio entre as unidade de óxido de etileno e a água e entre a água e a camada hidratada, camada esta na qual as cadeias hidrofílicas formam ligações de hidrogênio com a água, e ainda, pela interação hidrofóbica entre as cadeias hidrofóbicas dos tensoativos e a fase oleosa (CAO et al., 2005).

Ao compararem-se os tensoativos empregados e analisando-se o comportamento de fases destes sistemas, observa-se que as propoxilas e etoxilas associadas parecem favorecer a formação de fases lamelares enquanto que somente etoxilas favorecem a formação de fases cúbicas e hexagonais.

Figura 20 - Estrutura molecular dos tensoativos OLETH-2, CETETH-10, PPG-5-CETETH-20 e T 701 e da fase oleosa ácido esteárico.



Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al. (2018); CARVALHO et al. (2012); KANICKY; SHAH (2002) e MITRA; PAUL (2005).

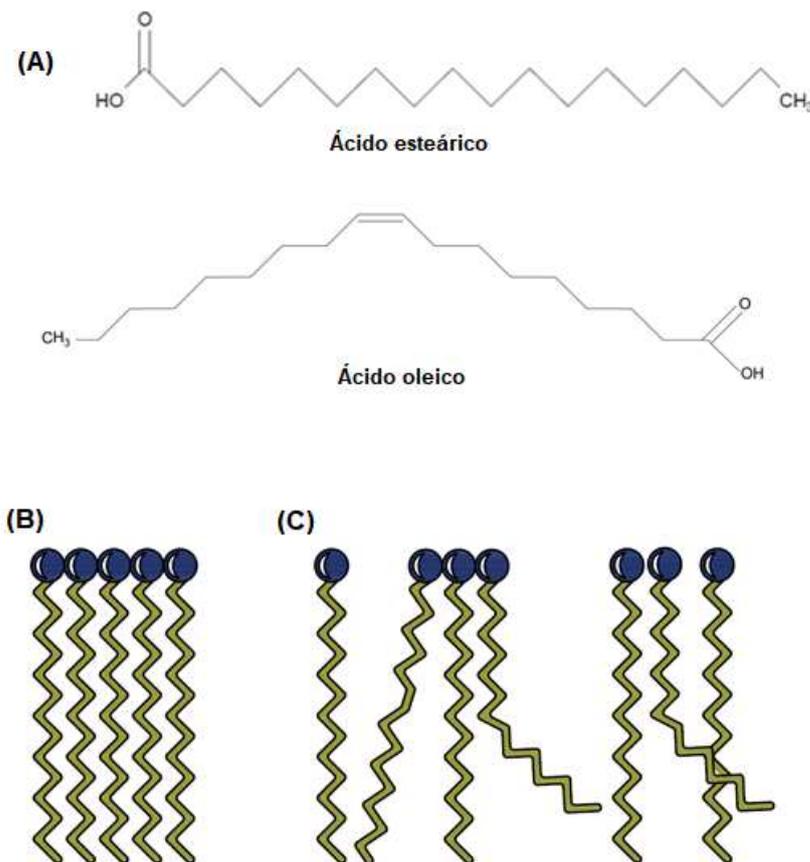
A partir dos resultados obtidos, selecionou-se uma formulação de cada um dos diagramas em que foi possível a formação de sistemas líquido cristalinos (Diagramas 2, 3 e 4). O critério utilizado para a escolha desses sistemas foi a baixa concentração de tensoativo a fim de minimizar possíveis irritações ao tecido cutâneo (LÉMERY et al., 2015). Além disso, os sistemas líquido cristalinos selecionados foram compostos por fase lamelar, quando já fora possível a formação dessa mesofase no diagrama, ou fase hexagonal, quando não foi possível a formação de fase lamelar no diagrama correspondente. Dessa forma, as formulações escolhidas foram C4, P e T2.

Apesar de terem sido formados cristais líquidos a partir dos diagramas, esses possuem apenas uma classe de lipídeos (ácido graxo) que compõem a barreira lipídica da pele e à aplicação de apenas um tipo de LF tem sido atribuída uma taxa de recuperação cutânea reduzida ou ainda um agravamento da função de barreira prejudicada (MAN; FEINGOLD; ELIAS, 1993). Por isso, foram feitas quatro adições aos sistemas selecionados, como será visto nos itens 5.2 a 5.5, de modo a obter-se cristais líquidos com uma completa mistura lipídica fisiológica organizados em fase lamelar, que é justamente a mesma organização da barreira lipídica normal.

5.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO OLEICO

O ácido oleico (AO) (Figura 21A) é um ácido graxo longo que possui 18 átomos de carbono em sua cadeia (ligação dupla em configuração *cis* no carbono 9) e um grupo funcional carboxílico. Sendo assim, pode ser tido como um análogo monoinsaturado do ácido esteárico (SMALL, 1984).

Figura 21 - Estrutura molecular do ácido esteárico e do ácido oleico (*cis*) (A) e diferença entre empacotamento de ácidos graxos saturados (B) e insaturados (C).



Fonte: Adaptado de KANICKY; SHAH (2002).

Devido à semelhança molecular do AE e do AO, avaliou-se o comportamento de fases com a associação desses ácidos graxos, a fim de elucidar a influência da modificação do nível de insaturação da fase oleosa e a consequente alteração na configuração molecular dos ácidos graxos, nos sistemas selecionados. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito da substituição parcial da fase oleosa composta por ácido esteárico por ácido oleico nos sistemas C4, P e T2.

Formulação	Composição (% p/p)					Classificação visual	MLP	
	Ácido esteárico	Ácido oleico	CETETH-10	PPG-5-CETETH-20	T 701			Água
C4	10,0	0,0	60,0	-	-	30,0	STAV	Hexagonal
1C4AO	5,0	5,0	60,0	-	-	30,0	STAV	Hexagonal
2C4AO	4,0	6,0	60,0	-	-	30,0	STAV	Hexagonal
3C4AO	3,0	7,0	60,0	-	-	30,0	STV	Hexagonal
4C4AO	2,0	8,0	60,0	-	-	30,0	STV	Hexagonal
P	5,0	0,0	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
1PAO	2,5	2,5	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
2PAO	2,0	3,0	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
3PAO	1,5	3,5	-	60,0	-	35,0	STV	Lamelar
4PAO	1,0	4,0	-	60,0	-	35,0	STV	Lamelar
T2	10,0	0,0	-	-	70,0	20,0	STAV	Lamelar
1T2AO	5,0	5,0	-	-	70,0	20,0	STAV	Lamelar
2T2AO	4,0	6,0	-	-	70,0	20,0	STV	Lamelar
3T2AO	3,0	7,0	-	-	70,0	20,0	STV	Lamelar
4T2AO	2,0	8,0	-	-	70,0	20,0	STV	Lamelar

Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas transparentes altamente viscosos (STV); Microscopia de luz polarizada (MLP).

Na Tabela 2 pode ser observado um aumento da fluidez nos três sistemas com o acréscimo de AO nos sistemas. Nos sistemas C4 e P, o aumento da fluidez ocorreu quando o AO passou a compor 70% da fase oleosa e no sistema T2 essa modificação visual ocorreu quando o AO representou 60% da fase oleosa. Assim, nota-se que em sistemas visualmente mais viscosos (C4 e P) foi necessária uma quantidade maior de AO para promover a formação de sistemas mais fluidos.

Com a redução visual da viscosidade dos sistemas, estes passaram da classificação STAV para a STV. A classificação dos sistemas em STAV e STV indica a ausência ou presença de fluidez das amostras quando expostas à movimentação manual dos frascos a favor da gravidade, respectivamente.

A capacidade de o AO favorecer a formação de estruturas menos rígidas já fora reportada por Srisuk e colaboradores (2012), os quais verificaram que a presença de AO em lipossomas os tornou deformáveis e elásticos.

O aumento da fluidez encontrado nos sistemas aqui propostos pode indicar a ocorrência de impedimento estérico entre as cadeias do AE e AO, a partir de determinada concentração de AO na fase oleosa de cada um dos sistemas. Sugere-se que uma fase oleosa composta apenas por ácidos graxos saturados (ácido

esteárico) apresente um denso empacotamento com provável orientação paralela (Figura 21B), em que as cadeias apolares interajam intimamente. A presença de ligação dupla (AO) na fase oleosa introduz um ângulo que desestabiliza as interações hidrofóbicas e o ordenamento, devido à conformação curva característica da configuração *cis* (Figura 21C), o que torna a fase oleosa menos coesa, verificada pelo aumento da fluidez dos sistemas (KANEKO; YANO; SATO, 1998; ROACH et al., 2004).

Uma evidência que vai ao encontro dessa propriedade do AO em desestabilizar agregados lipídicos é o mecanismo pelo qual ele promove o aumento da permeabilidade cutânea que consiste em perturbar as interações entre ácidos graxos saturados presentes no EC (AUNGST, 1989; FRANCOEUR; GOLDEN; POTTS, 1990).

Apesar de o AO ter favorecido a formação de sistemas menos rígidos, essa alteração não foi acompanhada da modificação de fase, o que reforça a teoria de que o AE parece ter grande influência na formação de fases nos três sistemas e na viscosidade dos mesmos. Sendo assim, infere-se que os sistemas contendo AE como fase oleosa são altamente viscosos e apresentam-se na forma de estruturas hexagonais ou lamelares pela grande influência desse ácido graxo. Uma vez que uma parte deste foi substituída por AO, a fase oleosa passou a ser mais fluida, assim como os sistemas resultantes, mas sem a concomitante transição de fase.

Alguns estudos relatam a alteração da viscosidade com a modificação da proporção de alguns componentes, especialmente da água ou com a adição de outro componente. Borné, Nylander e Khan (2001), por exemplo, descreveram a redução da viscosidade de fase lamelar sem a danificação da estabilização entrópica. Amar-Yuli e colaboradores (2008), por sua vez, demonstraram a redução da viscosidade de fases hexagonais pela incorporação de aditivos, como o etanol. Entretanto, de modo bastante curioso, os resultados aqui encontrados sugerem que a modificação da viscosidade por duas maneiras diferentes: seja pela introdução de um componente diferente durante a formulação ou pela alteração na proporção de algum constituinte.

Com base nos resultados encontrados, o AO pode ser utilizado em diferentes proporções para controlar o aspecto viscoso visual de sistemas sem destruir a estrutura formada sem sua adição, o que é desejável quando a alta viscosidade de sistemas líquido cristalinos limita sua utilização e sem o uso da dispersão de mesofases (ALMGREN et al., 2007).

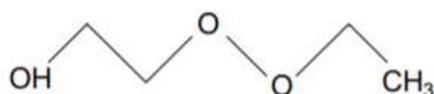
Considerando que o AO não favoreceu a formação de fases lamelares em todos os sistemas, que os sistemas formados sem sua incorporação apresentaram viscosidade visual compatível com a via tópica e que há relatos na literatura que a presença de AO em misturas de lipídeos fisiológicos não apresentou eficácia superior em comparação com petrolato na recuperação da barreira cutânea (THORNFELDT, 1999; LODÉN; BÁRÁNY, 2000), não prosseguiu-se o estudo com nenhum dos sistemas compostos por AO.

5.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE COTENSOATIVO DIETILENOGLICOL MONOETIL ÉTER

Estudos têm demonstrado que a adição de álcoois de cadeia carbônica curta pode influenciar o comportamento de fase de sistemas líquido cristalinos. De modo geral, essas moléculas possuem a capacidade de se acumularem no filme interfacial formado por tensoativos e por isso, passam a ser denominados cotensoativos. Têm a capacidade de aumentar a fluidez do filme interfacial e o valor efetivo do PEC e, desse modo, favorecem a formação de estruturas com outras curvaturas, em especial menos curvas (DE GENNES; TAUPIN, 1982; FONTELL et al., 1991; FIROUZI et al., 1997).

Nesse sentido, avaliou-se a adição de dietilenoglicol monoetil éter (CoT) (Figura 22), comercialmente conhecido como Transcutol P[®], um álcool de cadeia curta reconhecido promotor da permeação cutânea de diversos fármacos e aditivo utilizado em sistemas líquido cristalinos (REN et al., 2014; SOLER et al., 2012; ZHANG et al., 2015), em diferentes concentrações.

Figura 22 - Estrutura molecular do cotensoativo dietilenoglicol monoetil éter.



Dietilenoglicol monoetil éter

Fonte: Adaptado de OSBORNE (2011).

Em estudo realizado por Javadzadeh e Hamishehkar (2011), CoT na concentração de 2% (p/p) em gel contendo MTX, promoveu um aumento maximizado da penetração do fármaco. Os autores propuseram que esse promotor penetre

rapidamente na pele e se deposite nesse tecido devido às suas propriedades físico-químicas e efeito de grau médio a elevado em relação à solubilidade.

A Tabela 3 apresenta a composição final exata dos sistemas formados, sua classificação visual e as estruturas líquido cristalinas observadas através da MLP.

Tabela 3 - Efeito da associação do dietilenoglicol monoetil éter (CoT) aos sistemas C4, P e T2, compostas por ácido esteárico como fase oleosa.

Formulação	Composição (% p/p)					Classificação visual	MLP	
	Ácido esteárico	CETETH-10	PPG-5-CETETH-20	T 701	Água			CoT
C4	10,00	60,00	-	-	30,00	0,00	STAV	Hexagonal
1C4CoT	9,80	58,82	-	-	29,41	1,96	STAV	Hexagonal
2C4CoT	9,61	57,69	-	-	28,85	3,85	STAV	Hexagonal
3C4CoT	9,43	56,60	-	-	28,30	5,66	STAV	Hexagonal
4C4CoT	9,26	55,55	-	-	27,78	7,41	STAV/STV	Hexagonal
5C4CoT	9,09	54,55	-	-	27,27	9,09	STAV/STV	Hexagonal
P	5,00	-	60,00	-	35,00	0,00	STAV	Lamelar
1PCoT	4,90	-	58,82	-	34,31	1,96	STAV	Hexagonal
2PCoT	4,81	-	57,69	-	33,65	3,85	STAV	Hexagonal
3PCoT	4,72	-	56,60	-	33,02	5,66	STAV/STV	Hexagonal
4PCoT	4,63	-	55,55	-	32,41	7,41	STAV/STV	Hexagonal
5PCoT	4,55	-	54,55	-	31,82	9,09	STAV/STV	Hexagonal
T2	10,00	-	-	70,00	20,00	0,00	STAV	Lamelar
1T2CoT	9,80	-	-	68,63	19,61	1,96	STAV	Lamelar
2T2CoT	9,61	-	-	67,31	19,23	3,85	STAV/STV	Lamelar
3T2CoT	9,43	-	-	66,04	18,87	5,66	STAV/STV	Lamelar
4T2CoT	9,26	-	-	64,82	18,52	7,41	STAV/STV	Lamelar
5T2CoT	9,09	-	-	63,64	18,18	9,09	STAV/STV	Lamelar

Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas transparentes viscosos (STV); Microscopia de luz polarizada (MLP).

Sistemas com menor viscosidade foram formados com sucesso em sistemas formados por cada um dos diferentes três tensoativos estudados, mantendo-se, entretanto, em qualquer concentração empregada, a formação de sistemas líquido cristalinos. Com essa alteração visual, os sistemas passaram a ser classificados como STAV/STV porque não eram tão viscosos (como anteriormente, sem a adição do cotensoativo) mas ainda não eram fluidos quando os frascos eram expostos à movimentação manual a favor da gravidade.

Essa redução na viscosidade foi observada com a adição de CoT na concentração de 7,41% (p/p) no sistema C4. No sistema P, a redução na viscosidade ocorreu com uma quantidade menor de CoT adicionado, sendo já observada quando

a concentração de dietilenoglicol monoetil éter representava 5,66 % (p/p). No sistema T2, por sua vez, essa alteração ocorreu com uma concentração de álcool ainda menor, com concentrações de no mínimo 3,85% (p/p).

Desse modo, observa-se que, apesar de haver uma redução da viscosidade dos sistemas com a adição de CoT, em comparação com o sistema inicial que não o continha, são necessárias diferentes concentrações de CoT para que essa alteração, visualmente observada ocorra.

Observa-se ainda, que a redução de viscosidade não foi acompanhada de transformação de fase nos sistemas contendo tensoativo CETETH-10 e T701, para qualquer concentração de dietilenoglicol monoetil éter estudada, uma vez que a fase hexagonal e lamelar, respectivamente, foi mantida.

Entretanto, no sistema formado por PPG5-CETETH-20, a adição de álcool na menor concentração utilizada (1,96% p/p) já possibilitou a transição de fase lamelar para a hexagonal, a qual se manteve mesmo com maiores concentrações de CoT.

Sugere-se que, conforme proposto por Shah e Paradkar (2007), no sistema P, com a adição mínima de dietilenoglicol monoetil éter, houve uma considerável redução da água disponível para a formação da mesofase do sistema líquido cristalino, o que favoreceu a transição da fase lamelar para a fase hexagonal após a adição. De fato, como observado no Diagrama 3, a redução da quantidade de água da região em que foram formadas fases lamelares propicia um maior empacotamento dos sistemas, favorecendo a formação de fases hexagonais.

Nos outros dois sistemas (C4 e T2), uma ampla quantidade de álcool pode ser utilizada para controlar a viscosidade de fases hexagonais ou lamelares, respectivamente, sem desestruturá-las. Pode ser sugerido que, assim como proposto por Amar-Yuli e colaboradores (2008), a molécula de CoT compete pela água da mesofase hexagonal ou lamelar tornando a cabeça polar do tensoativo desidratada, o que favorece estruturas menos compactas e, portanto, menos viscosas.

Assim sendo, o CoT parece ter agido como cotensoativo ao promover a redução da viscosidade dos sistemas ao qual foi adicionado e pode ser utilizado para duas finalidades distintas, simultâneas ou não, a depender do sistema ao qual é adicionado. A adição desse álcool pode favorecer a transição de fases e/ou a redução da viscosidade visual, podendo ser empregado quando for desejável a formação de determinada mesofase a partir de outra, mas mantendo a aparente viscosidade do

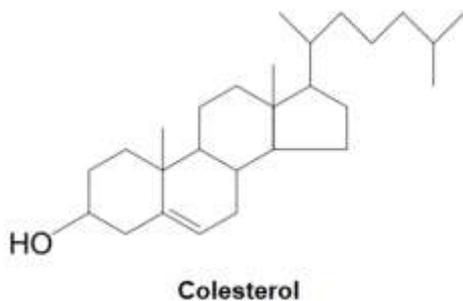
sistema inicial ou quando a alta viscosidade de um sistema limitar a sua aplicação mantendo a fase inicialmente formada e tido como ideal.

Uma vez que a adição de dietilenoglicol monoetil éter manteve a fase lamelar no sistema com tensoativo T701, o sistema contendo uma concentração intermediária de cotensoativo (3T2CoT) foi escolhido para posteriores estudos por possui um promotor de permeação cutânea de MTX.

5.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE COLESTEROL

O colesterol (CHO) é uma molécula anfifílica que consiste em um anel tetracíclico planar, uma cauda hidrofóbica e um grupo polar hidroxila, conforme apresentado na Figura 23 (OSTLUND JUNIOR, 2002).

Figura 23 - Estrutura molecular do colesterol.



Fonte: Adaptado de OSTLUND JUNIOR (2002).

Como componente natural de membranas celulares e da matriz lipídica cutânea (GRAY et al., 1982), o CHO além de atuar em processos fisiológicos da pele como inibição de enzimas envolvidas no processo de descamação, estabilização da camada lipídica do EC mantendo os corneócitos unidos, também exerce influência direta na estrutura líquido cristalina tanto das membranas lipídicas quanto da matriz intercelular (MADISON et al., 1987; SATO et al., 1998; ELIAS et al., 2014).

O CHO e seus ésteres têm a capacidade de formar uma variedade de sistemas líquido cristalinos, inclusive criando sistemas com características próximas à organização lipídica epidérmica e representa uma classe de moléculas com propriedades de promover um aumento da permeabilidade cutânea (BOIKO et al., 2013).

Partindo então desses pressupostos, adicionou-se CHO aos sistemas selecionados de modo a verificar a influência dessa associação no comportamento de fases dos mesmos. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da adição de colesterol à fase oleosa composta por ácido esteárico aos sistemas C4, P e T2.

Formulação	Composição (% p/p)					Classificação visual	MLP	
	Ácido esteárico	Colesterol	CETETH-10	PPG-5-CETETH-20	T 701			Água
C4	10,0	0,0	60,0	-	-	30,0	STAV	Hexagonal
C4CHO	7,0	3,0	60,0	-	-	30,0	STV	Lamelar
P	5,00	0,0	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
PCHO	3,5	1,5	-	60,0	-	35,0	SO	-
T2	10,0	0,0	-	-	70,0	20,0	STAV	Lamelar
T2CHO	7,0	3,0	-	-	70,0	20,0	SF	-

Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas transparentes viscosos (STV); Sistemas opacos (SO); Separação de fases (SF), Microscopia de luz polarizada (MLP).

Como pode ser observado na Tabela 4, a associação de CHO aos sistemas C4, P e T2 parece exercer bastante influência no comportamento de fases e a magnitude dessa influência parece depender do sistema líquido cristalino ao qual o CHO foi adicionado, pois três distintos sistemas foram formados.

No sistema T2 foi observada a separação de fases após a associação com CHO, de modo que se verificou a formação de duas fases distintas: a fase superior era composta de uma fase com aspecto ceroso enquanto a fase inferior tinha o aspecto de um líquido oleoso. Sendo assim, a associação do CHO ao sistema T2 foi capaz de manter a mesofase lamelar, na concentração utilizada, provavelmente por provocar a desestabilização do sistema líquido cristalino. Este comportamento pode ser explicado pela observação relatada por Green et al. (1976), os quais verificaram a capacidade desse tensoativo em precipitar de micelas compostas por CHO.

Apesar de os tensoativos PPG-5-CETETH-20 e CETETH-10, possuírem relativa semelhança estrutural (Figura 20), resultados totalmente distintos foram observados a partir da associação do CHO. Esses tensoativos diferem-se sobretudo, do ponto de vista molecular, pela composição da cabeça polar que é composta por 10 unidades etoxiladas e 20 unidades etoxiladas e 5 propoxiladas, respectivamente. Partindo-se do pressuposto de que a interação entre tensoativos e CHO é inversamente proporcional ao número de grupos de óxido de etileno (OGINO; OTA,

1976; FORGÁCS et al., 2004), presume-se que a diferença encontrada pela presença de CHO nos sistemas C4 e P se deva, portanto, ao tipo de tensoativo empregado.

No sistema com o tensoativo PPG-5-CETETH-20, ou seja, no sistema P, a associação do CHO à fase lamelar promoveu a passagem de sistema líquido cristalino para uma emulsão convencional, classificado visualmente como sistema opaco. Tal evento pode ter ocorrido devido à baixa interação entre CHO e o tensoativo empregado, pois este possui um grande número de unidades etoxiladas. A partir dessa reduzida interação, o CHO provavelmente tenha passado a compor a fase oleosa do sistema juntamente com o AE.

Assim sendo, a substituição parcial do AE pelo CHO pode ter reduzido o EHL da fase oleosa, uma vez que o CHO (EHL = 3-4) é mais lipofílico do que aquele ácido graxo (PASQUALI; BREGNI, 2006). Esse aumento da lipofilia da fase oleosa, portanto, faz com que a estrutura líquido cristalina seja perdida e promova a formação de uma emulsão comum.

O comportamento de fases desse sistema (Figura 15) demonstra que o aumento da concentração de fase oleosa no sistema favorece a formação de sistemas opacos a partir de cristais líquidos. Esse comportamento, então, corrobora com a hipótese de que o aumento do EHL da fase oleosa provocado pela associação de CHO ao sistema, tenha sido o responsável pela formação encontrada.

No sistema com o tensoativo CETETH-10, ou seja, no C4 a associação do CHO favoreceu a transição da fase hexagonal para a fase lamelar (Figura 24). Possivelmente, a quantidade de unidades etoxiladas na porção hidrofílica do tensoativo possibilitou a sua interação com as moléculas de CHO, que devido a suas propriedades lipofílicas agiu como cotensoativo.

Figura 24 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C4 e C4CHO.



Fonte: Da autora.

Assume-se, portanto, que as moléculas de CHO se interpõem entre as moléculas de tensoativo próximas às suas cabeças. Essa disposição então

proporciona uma redução da curvatura interfacial, promovendo a transição da fase hexagonal para a fase lamelar.

Estudos prévios também descreveram a capacidade de o CHO atuar como cotensoativo, em diferentes tipos de formulações como microemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas, reduzindo a curvatura do filme interfacial (JUPING et al., 2003; CASTRO et al., 2007; ROZNER; ASERIN; GARTI, 2008).

Desse modo, a associação de CHO ao sistema CETETH-10 foi a primeira das associações estudadas que possibilitou, simultaneamente, que dois objetivos desse trabalho fossem alcançados: a formação de um sistema líquido cristalino lamelar, organização semelhante à matriz lipídica intercelular do EC, e a associação de dois LF. Por isso, o sistema C4CHO foi selecionado para posteriores estudos de caracterização.

Esses cristais líquidos com CHO podem ainda melhorar a penetração/permeação cutânea de fármacos e promover a recuperação da barreira cutânea que se encontra prejudicada na psoríase ao fornecer mais uma classe de lipídeos essencial aos corpos lamelares.

Esse estudo, portanto, demonstra que o comportamento dos sistemas frente a presença de CHO parece ser dependente da interação deste com as moléculas de tensoativo, principalmente dos grupos etoxilados presentes em seu núcleo hidrofílico, sendo que a associação desta molécula exerce grande influência na organização de cristais líquidos.

5.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE FASES COM ASSOCIAÇÃO DE CERAMIDA 3

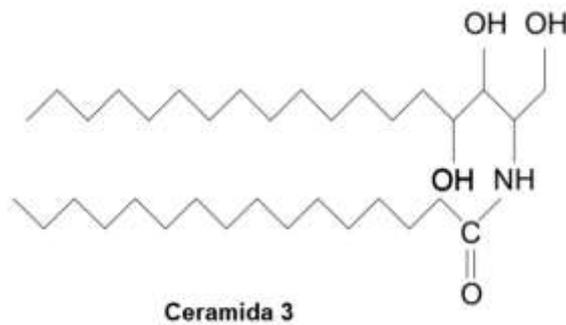
A ceramida é uma amida de ácido graxo com uma longa cadeia amina hidroxilada. Os ácidos graxos e as cadeias longas possuem variados comprimentos, grau de insaturação ou hidroxilação e, assim, então, existem um grupo de moléculas chamadas de ceramidas, sendo reconhecidos 9 tipos de ceramidas na matriz lipídica do EC, representando então, a maior classe de lipídeos (ROBSON et al., 1994).

As ceramidas exercem um papel indispensável na organização líquido cristalina lamelar dos lipídeos intercelulares cutâneos, sendo o principal componente da matriz intercelular do EC (GRAY et al., 1982; BOUWSTRA et al., 1998) e têm um papel efetivo em manter a barreira da pele reduzindo a TEWL (MEGURO et al., 2000). As

ceramidas, ainda, representam um grupo de interesse para preparações farmacêuticas e cosméticas por serem promotores de permeação cutânea relacionados com o EC (VÁVROVÁ et al., 2003). Além disso, estudos têm demonstrado uma importante função do grupo de ceramidas ao atuarem como segundos mensageiros, em vários processos biológicos como proliferação celular, diferenciação terminal e apoptose (VERHEIJ et al., 1996).

A ceramida 3 (CER) (Figura 25), em particular, utilizada neste estudo, é a mais abundante das ceramidas da pele saudável humana (YILMAZ; BORCHET, 2006) e é especialmente relacionada com a função de barreira da pele, estando, inclusive, em níveis reduzidos em lesões psoriáticas (FARWANAH et al., 2005; HUANG; CHANG, 2008).

Figura 25 - Estrutura molecular da ceramida 3.



Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2003).

Tendo em vista todas essas propriedades das ceramidas no tratamento cutâneo, adicionou-se a CER aos sistemas selecionados de modo a verificar a influência dessa associação no comportamento de fases dos mesmos. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito da adição de ceramida 3 à fase oleosa composta por ácido esteárico e colesterol aos sistemas C4CHO, P e T2.

Formulação	Composição (% p/p)						Classificação visual	MLP	
	Ácido esteárico	Colesterol	Ceramida 3	CETETH-10	PPG-5-CETETH-20	T 701 Água			
C4CHO	7,0	3,0	0,0	60,0	-	-	30,0	STV	Lamelar
C4CHOCER	6,3	2,7	1,0	60,0	-	-	30,0	STAV	Lamelar
P	5,0	-	0,0	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
PCER	4,5	-	0,5	-	60,0	-	35,0	STAV	Lamelar
T2	7,0	-	0,0	-	-	70,0	20,0	STAV	Lamelar
T2CER	6,3	-	1,0	-	-	70,0	20,0	SO	-

Fonte: Da autora.

Sistemas transparentes altamente viscosos (STAV); Sistemas transparentes viscosos (STV); Sistemas opacos (SO); Separação de fases (SF); Microscopia de luz polarizada (MLP).

Como pode-se observar na Tabela 5, a associação de CER aos sistemas C4, P e T2 parece exercer pouca influência no comportamento de fases e a magnitude dessa influência parece depender do sistema líquido cristalino ao qual a CER foi associada, pois dois distintos sistemas foram formados a partir das três fases lamelares selecionadas.

Novamente, assim como no estudo da associação com CHO, as diferenças encontradas nos sistemas resultantes da associação com CER possivelmente pode ser explicada pela interação entre a CER e o tensoativo, especialmente pelo caráter hidrofílico ou lipofílico deste.

No sistema com o tensoativo T 701, ou seja, no sistema T2, a associação de CER à fase lamelar promoveu a passagem de sistema líquido cristalino para uma emulsão convencional, classificado visualmente como sistema opaco. Como o tensoativo T 701 possui baixo valor de EHL, acredita-se que haja uma inibição da interação entre tipo de tensoativo e a CER, de modo que a estrutura líquido cristalina foi perdida após a associação. Assim, a associação de CER, na concentração utilizada, inibe a formação de cristais líquidos.

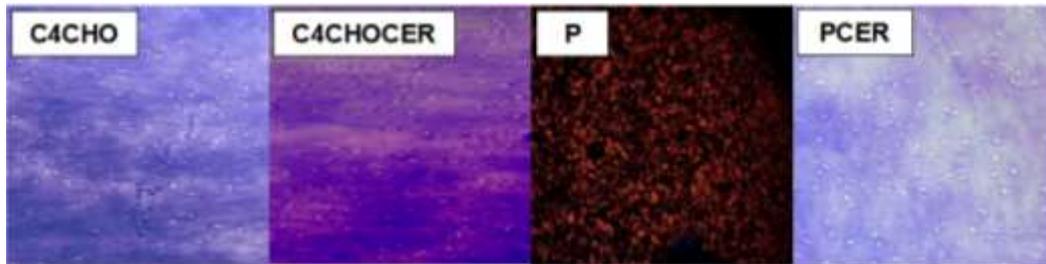
Um resultado, bastante diferente foi encontrado com o uso de CETETH-10 e PPG-5-CETETH-20, os quais possuem EHL mais elevado, respectivamente, 12,9 e 15 (LUCHE; SANTONI; RABILLOUD, 2003; CARVALHO et al., 2012).

Iwai, Fukasawa e Suzuki (1997) demonstraram que a interação entre pseudoceramida e tensoativos é otimizada quando a molécula de tensoativo possui entre 5 e 25 unidades etoxiladas. Assim sendo, a interação entre CER e tensoativos com maiores valores de EHL parece seguir uma tendência bastante semelhante e pode explicar, ao menos parcialmente, os resultados encontrados neste trabalho.

Provavelmente, a presença de 10 e 20 unidades etoxiladas (ALMEIDA et al., 2018) (Figura 20), respectivamente, nos tensoativos CETETH-10 e PPG-5-CETETH-20 encontra-se na faixa ótima para interação com CER e, possibilitou a manutenção da estrutura líquido cristalina.

Resultados semelhantes foram encontrados a partir da associação de CER aos sistemas contendo o tensoativo PPG-5-CETETH-20 e CETETH-10, ou seja, ao sistema P e C4. A CER, em cada um desses dois sistemas, na concentração empregada, pode ser incorporada nas estruturas lamelares anteriormente formadas sem alteração da estrutura líquido cristalina (Figura 26).

Figura 26 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas C4CHO, C4CHOCER, P e PCER.



Fonte: Da autora.

A capacidade de a ceramida estabilizar fases lamelares também fora reportada por Sot e colaboradores (2005), em que a presença de ceramida 2, uma ceramida de cadeia curta com estrutura estrutural muito similar à CER, em misturas de fosfolípeos inibiu a transição da fase lamelar para a fase hexagonal.

Esse comportamento também pode ser explicado nos termos do elevado valor de PEC das ceramidas (PEC=1), o que favorece a formação de bicamadas flexíveis, típicas de mesofases lamelares (ISRAELACHIVILI, 2011).

Sendo assim, no sistema contendo o tensoativo PPG-5-CETETH-20, após a associação com CER há a formação de mesofase lamelar com dois lipídeos: o AE e a CER. O favorecimento de formação de fase lamelar em mistura de AE e ceramida em fração molar similar à usada no presente trabalho já fora demonstrado por Ohta e Hatta (2002), os quais evidenciaram ainda que o espaço lamelar formado tem a mesma dimensão de duas moléculas de ceramida e/ou AE e que as cadeias carbônicas dos lipídeos encontram-se dispostas uniforme e perpendicularmente à superfície.

Portanto, com o tensoativo PPG-5-CETETH-20 foi possível a formação de um sistema líquido cristalino com organização similar aos lipídeos do EC e com os LF AE e CER. Espera-se que a associação da CER resulte em um produto altamente funcional no tratamento de desordens cutâneas, sobretudo da psoríase, na qual a barreira cutânea encontra-se disfuncional. Por isso, o sistema PCER foi selecionado para foi escolhido para posteriores estudos de caracterização.

No sistema C4CHO, por sua vez, após a associação com CER, denominado C4CHOCER, há a formação de mesofase lamelar com os três LF. Desse modo, com o tensoativo CETETH-10, de maneira ainda mais atrativa, foi possível a formação de um sistema líquido cristalino com organização similar aos lipídeos do EC e com as três classes de LF: AE, CHO e CER. Sugere-se que a aplicação tópica desse sistema

seja ainda mais eficaz em recuperar a funcionalidade da pele psoriática, e restaurar a homeostase cutânea ao fornecer uma mistura completa de LF necessários para a formação de corpos lamelares normais. Por isso, o sistema C4CHOCER foi selecionado para ser escolhido para posteriores estudos de caracterização.

Esse estudo, portanto, demonstra que o comportamento dos sistemas frente a presença de CER parece ser dependente do equilíbrio hidrófilo-lipófilo do tensoativo e para os com maior valor desse parâmetro, parece ser muito importante a interação deste com as moléculas de tensoativo, principalmente dos grupos etoxilados presentes em seu núcleo hidrofílico, sendo que a associação desta molécula exerce pouca influência na organização de cristais líquidos.

5.6 TESTE DE INCORPORAÇÃO DO METOTREXATO E DETERMINAÇÃO DE PH DOS SISTEMAS

O MTX pode ser incorporado na maioria dos sistemas selecionados na concentração desejada de 1%.

Durante um período de seis meses não foram observadas modificações macroscópicas (opacidade ou separação de fases) ou precipitação do fármaco em nenhum dos sistemas mantidos fechados, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o que sugere uma solubilização total do fármaco. Sendo assim, a adição do fármaco e a mudança do potencial hidrogeniônico (pH) da fase aquosa não proporcionaram modificações significativas em nenhum dos sistemas estudados.

A incorporação de MTX a 1% nas mesofases líquido cristalinas aqui propostas foi similar à quantidade desse fármaco incorporada em cristais líquidos descritos na literatura e sugeridos por Cintra e colaboradores (2016). Além disso, essa é justamente a concentração utilizada em um gel tópico proposto por Eskicirak, Zemheri e Cerkezoglu (2006), os quais obtiveram uma melhora significativa da severidade clínica em pacientes com psoríase vulgar, após 4 semanas de tratamento.

Os valores de pH obtidos para os diferentes sistemas estudados incorporados com MTX estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores do potencial hidrogeniônico (pH) dos sistemas selecionados incorporados com metotrexato.

Formulação	pH
C4CHO	7,49
C4CHOCER	7,50
P	7,43
PCER	7,69
T2	7,33
3T2CoT	7,60

Fonte: Da autora.

Observando-se os valores obtidos da medição de pH dos sistemas propostos, verifica-se que os sistemas tiveram valores de pH entre 7,33 e 7,69. Nota-se ainda que ocorreu uma pequena redução dos valores de pH dos sistemas em comparação com a fase aquosa utilizada para a preparação dos mesmos, pois a fase aquosa de cada um dos sistemas era composta por solução de MTX pH 8,0.

Todos os sistemas incorporados com MTX tiveram valores de pH situados dentro da faixa de tolerância biológica para produtos cutâneos, ou seja, de 5,5 a 8,0 (AULTON, 2005).

Sendo assim, os sistemas propostos apresentam potencial para a veiculação do MTX para o tratamento tópico da psoríase e se mostram como uma alternativa farmacotécnica para a preparação de formulações tópicas contendo esse fármaco.

5.7 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA – TPA

Esta caracterização foi realizada a fim de determinar propriedades mecânicas das formulações, tais como compressibilidade, coesão e adesividade. Nesse sentido, a análise do perfil de textura é considerada muito importante para o máximo benefício ao paciente por possibilitar otimização do tratamento tópico (SENYIĞIT et al., 2011).

A compressibilidade é definida como o trabalho necessário para a deformação da amostra durante o primeiro ciclo de compressão. Esse parâmetro está relacionado com a ejeção da embalagem e a espalhabilidade da formulação na superfície da pele, e, portanto, com a facilidade de administração (JONES et al., 1997; JONES et al., 2000; SCHWARTZ, 1975).

O parâmetro coesão descreve a relação entre a área da curva força versus tempo do segundo ciclo de compressão e do primeiro ciclo de compressão. Assim

sendo, o valor obtido releva a capacidade de recuperação estrutural completa após o estresse da aplicação da formulação (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997; TAN; PEH; AL-HANBALI, 2000).

Por sua vez, a adesividade é definida pela área da força negativa no primeiro ciclo de compressão e indica o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a amostra e a sonda do experimento e demonstra a capacidade de melhoria da eficácia clínica através do aumento do tempo no local de administração (JONES et al., 2000; WOOLFSON et al., 1992).

Os resultados obtidos na análise do perfil de textura estão demonstrados detalhadamente na Tabela 7, na qual apresentam-se os dados analisados estatisticamente, e graficamente na Figura 27.

Não foi possível realizar as medidas de TPA na amostra 3T2CoT por ser mais líquida. Para a realização do teste TPA é necessário que a amostra ofereça resistência à entrada da prova analítica, denominada força de disparo. Para a análise de amostras líquidas seria necessária uma força de disparo menor, porém, nessas condições a prova analítica encontra resistência do ar, o que interfere na medição.

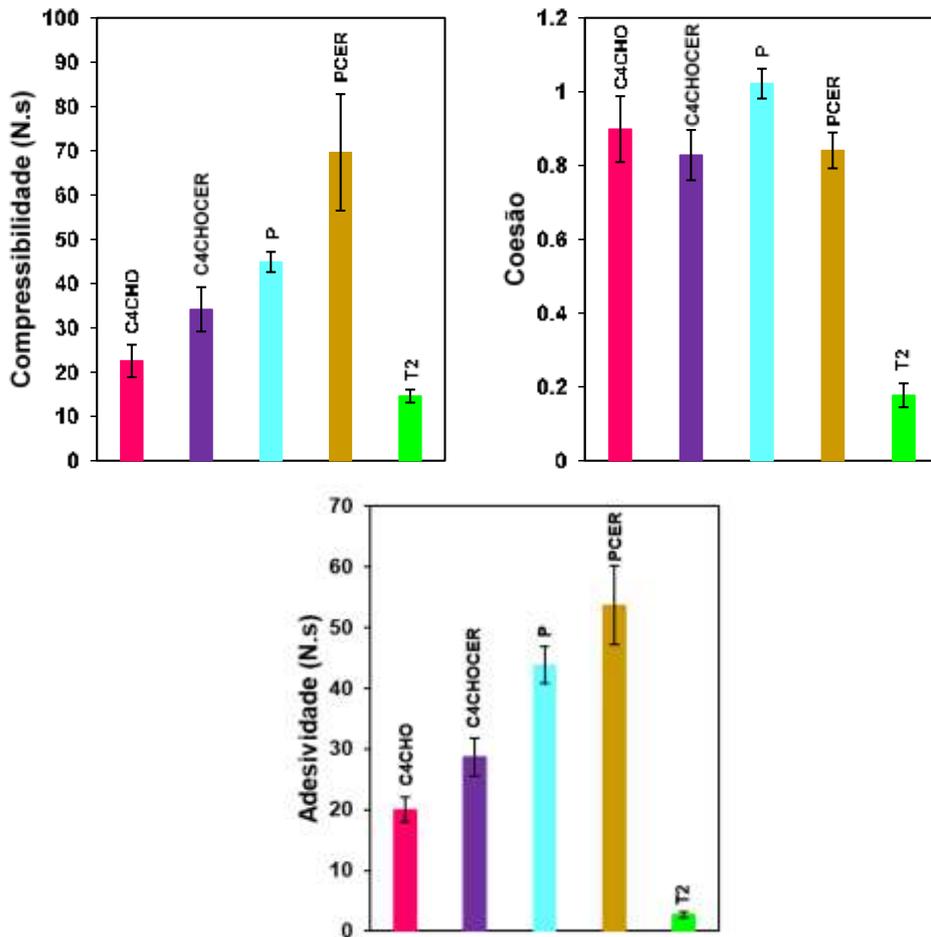
Tabela 7 - Valores médios e desvios padrões dos parâmetros compressibilidade, adesividade e coesão obtidos para os sistemas selecionados.

Formulação	Parâmetros		
	Compressibilidade (N.s)	Adesividade (N.s)	Coesão
C4CHO	22,538 ± 3,656 ^{cd}	20,010 ± 2,026 ^b	0,899 ± 0,089 ^{ab}
C4CHOCER	34,183 ± 5,021 ^{bc}	28,619 ± 3,150 ^b	0,828 ± 0,068 ^b
P	44,873 ± 2,271 ^b	43,807 ± 3,045 ^a	1,022 ± 0,040 ^a
PCER	69,639 ± 13,157 ^a	53,655 ± 6,451 ^a	0,841 ± 0,049 ^b
T2	14,574 ± 1,461 ^d	14,574 ± 1,461 ^c	0,177 ± 0,032 ^c

Fonte: Da autora.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna correspondem a médias com diferença não significativa ($p > 0,05$) de acordo com teste Tukey, para um mesmo parâmetro.

Figura 27 - Gráficos das medidas realizadas através da análise do perfil de textura - TPA quanto à compressibilidade, coesão e adesividade.



Fonte: Da autora.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os valores de compressibilidade, adesividade e coesão das fases lamelares desenvolvidas, de modo geral, apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A compressibilidade é um parâmetro que pode estar relacionado à rigidez da amostra, indicando que formulações com elevados valores de compressibilidade possuem ligações rígidas entre as moléculas que a compõem, propiciando a estabilidade das mesmas. A associação de CER nos sistemas C4CHO e P promoveram diferentes interferências nos valores de compressibilidade dos sistemas.

A associação de CER no sistema C4CHO parece não causar uma interferência significativa ($p > 0,05$). Sendo assim, é provável que a associação da CER ao sistema contendo tensoativo CETETH-10 favoreça a formação de fases lamelares com semelhante rigidez em comparação com a fase lamelar sem a associação.

Entretanto, a mesma associação no sistema P causou uma diferença significativa em relação ao parâmetro de compressibilidade, favorecendo a formação

de uma mesofase lamelar com compressibilidade cerca de 1,5 vezes maior e, além disso, com a maior compressibilidade ($p < 0,05$) dentre todas as fases lamelares. Portanto, sugere-se que a associação de CER ao sistema contendo tensoativo PPG-5-CETETH-20 promova a formação de mesofases com ligações ainda mais rígidas entre as moléculas de água, tensoativo e fase oleosa.

As amostras analisadas mostraram-se altamente coesas, ou seja, as interações entre os domínios lamelares dos sistemas são altas, sendo difícil a quebra dessas interações e, portanto, a desestruturação desses sistemas. Apesar de a coesão das mesofases lamelares estudadas possuírem valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), nota-se que houve uma pequena dispersão entre os valores e esses valores se mostraram próximos a 1. Esses resultados apontam então que a composição de tensoativo e as adições parecem ter menor influência na coesão estrutural de fases lamelares. Sendo assim, propõe-se que a capacidade das formulações em recuperarem sua estrutura inicial seja uma característica intrínseca deste tipo de mesofase e possivelmente também sistemas líquido cristalinos em geral. A única exceção foi o valor encontrado para a amostra T2, que possui coesão numericamente bastante inferior a das demais formulações e um valor próximo a 0. Sugere-se, portanto, que o primeiro ciclo de compressão pode ter causado um desarranjo nos domínios da estrutura lamelar, de modo que a segunda força para a penetrar esse sistema foi menor.

Novamente, a associação de CER nos sistemas C4CHO e P promoveu diferentes interferências no parâmetro de textura analisado, nesse caso, em relação à coesão.

A associação de CER no sistema C4CHO não parece causar uma interferência significativa ($p > 0,05$) na fase lamelar formada, de modo que a mesofase C4CHOCER formada após essa associação favorece a formação de um sistema com coesão similar. Sendo assim, é provável que a associação da CER ao sistema contendo tensoativo CETETH-10 favoreça a formação de fases lamelares com igual capacidade de recuperação estrutural após ser submetida a condições estressantes, como a aplicação.

Por outro lado, a mesma associação no sistema P causou uma diferença significativa em relação ao parâmetro de compressibilidade ($p < 0,05$), de modo que a associação de CER ao sistema P favoreceu a formação de uma fase lamelar com menor valor de coesão. Portanto, sugere-se que a associação da CER ao sistema

contendo tensoativo PPG-5-CETETH-20 promova a formação de mesofases com domínios lamelares relativamente menos coesos.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao parâmetro de adesividade entre sistemas compostos pelo mesmo tensoativo ($p > 0,05$), com e sem a presença de CER quando aplicável. Assim sendo, a presença de aditivos parece não ter grande influência nesse parâmetro mecânico das fases lamelares quando o tensoativo é mantido o mesmo. Sugere-se, portanto, que a adesividade seja devido, principalmente, às características do tensoativo empregado nas fases lamelares.

De modo geral, as fases lamelares mais coesas são também as mais adesivas e menos compressíveis. Pode-se então dizer que esses parâmetros variam de acordo com o tensoativo empregado e que o tensoativo PPG-5-CETETH-20 favorece a formação de sistemas mais coesos, seguido dos sistemas formados pelo tensoativo CETETH-10 e o tensoativo T 701 propicie a formação dos sistemas menos coesos.

Os menores valores dos parâmetros mecânicos avaliados já eram esperados para as fases lamelares compostas pelo tensoativo T 701. Essas amostras eram, nitidamente, mais fluidas que as demais e apresentavam do ponto de vista macroscópico a desorientação e os defeitos estruturais característicos de fases lamelares (YARIV et al., 2010). Assim sugere-se que além de não favorecer a estabilização de sistemas termonidamicamente estáveis, a conformação molecular deste tensoativo favoreça a formação de mesofases com domínios lamelares menos empacotados e mais flexíveis, o que é verificado pela reduzida coesão, adesividade e compressibilidade em comparação com os outros sistemas estudados.

Em relação aos outros dois tensoativos estudados, nota-se as fases lamelares compostas pelo tensoativo PPG-5-CETETH-10 são mais coesas, adesivas e menos compressíveis que as fases lamelares formadas pelo tensoativo CETETH-10. Sendo assim, sugere-se que a presença de um tensoativo com maior volume da porção hidrofílica (PPG-5-CETETH-10) favoreça a formação de fases lamelares com domínios lamelares mais empacotados e menos flexíveis, o que é verificado pela elevada coesão, adesividade e compressibilidade em comparação com o tensoativo com menor área hidrofílica (CETETH-10).

A determinação das características mecânicas forneceu informações a respeito das interações que ocorrem entre as moléculas das mesofases lamelares que são relevantes e necessárias para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico.

5.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FORÇA BIOADESIVA

Esta caracterização foi realizada a fim de determinar as forças necessárias para remover as formulações analisadas a partir da pele de orelha de porco utilizada neste estudo como substrato biológico como modo de avaliar a força bioadesiva *in vitro*.

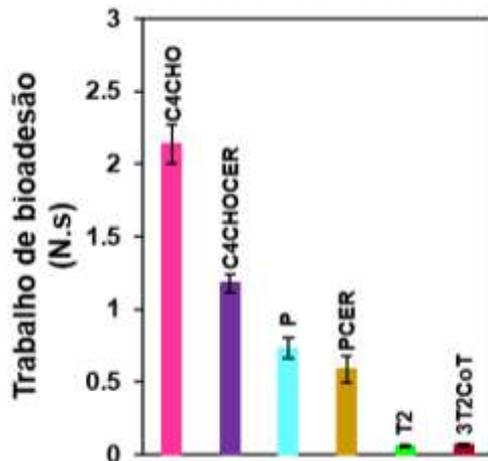
A bioadesão é definida como o estado no qual dois materiais, sendo pelo menos um de natureza biológica, se mantem unidos por um determinado tempo devido a presença de forças entre as interfaces. Inicialmente, ocorre um íntimo contato entre o material bioadesivo e o substrato biológico. Após essa fase, há a consolidação da adesividade por interações físico-químicas que permitem prolongada adesão (REPKA; MCGINITY, 2000; SMART, 2005).

A propriedade bioadesiva de sistemas de administração de fármacos traz como principal vantagem o aumento do tempo de permanência do fármaco no local de aplicação, sendo este, no caso de formulações tópicas cutâneas, a pele. Devido a esse contato mais íntimo da formulação com a barreira biológica, é possível manter uma alta concentração do fármaco nos tecidos alvo e assim, reduzir a frequência de aplicação do produto farmacêutico, o que conseqüentemente melhora o desempenho do tratamento clínico (WOODLEY, 2001; SMART et al., 2003; PARENTE et al., 2015).

Polímeros tem sido amplamente empregados em formulações bioadesivas, de modo que existem na literatura diversos estudos preparadas apenas com este tipo de material visando essa propriedade (HENRIKSEN et al., 1996; SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). Entretanto, cristais líquidos têm sido identificados como uma nova classe potencial de materiais bioadesivos, devido aos excelentes resultados observados em diferentes estudos (BENDER et al., 2005; DONG et al., 2006).

Nesse sentido, os valores médios obtidos para os parâmetros de trabalho bioadesivo das mesofases lamelares selecionadas encontram-se graficamente expostos na Figura 28.

Figura 28 - Gráfico da medida realizada através da avaliação *in vitro* da bioadesão, através da qual obteve-se o trabalho de bioadesão.



Fonte: Da autora.

De acordo com os resultados obtidos, o maior valor do parâmetro de trabalho de bioadesão foi encontrado para a fase lamelar C4CHO, enquanto que o menor valor foi obtido com a fase lamelar T2.

Pode-se notar ainda que, os valores desse parâmetro, em relação ao grupo de tensoativo empregado, foram maiores para as mesofases lamelares formadas pelo tensoativo CETETH-10 (C4CHO e C4CHOCER), valores mediados foram encontrados para os sistemas formados pelo tensoativo PPG-5-CETETH-20 (P e PCER) e os menores valores foram observados nos sistemas líquido cristalinos formados pelo tensoativo T 701 (T2 e 3T2CoT). Ou seja, a bioadesão parece decrescer na seguinte ordem, de acordo com o tensoativo empregado: CETETH-10 > PPG-5-CETETH-20 > T 701 ($p < 0,05$).

A menor bioadesão dos sistemas formados por T 701 era prevista por se tratarem de sistemas pouco coesos, conforme verificado no estudo de perfil de textura. Essa dificuldade de sistemas pouco coesos em se aderirem ao substrato biológico já fora reportada por Carvalho e colaboradores (2010).

Entretanto, ao serem comparados os sistemas formados pelos outros dois tipos de tensoativo (CETETH-10 e PPG-5-CETETH-20), um comportamento contrário ao esperado foi observado. Como será visto na análise reológica oscilatória, no próximo item, as fases lamelares P e PCER apresentaram maiores módulos de armazenamento (G'). Sendo assim, esperava-se que essas formulações obtivessem maiores valores de trabalho de bioadesão, pois formulações com altos valores de G' tendem a apresentar maiores valores de bioadesão. No entanto, alguns estudos demonstram que o comportamento contrário, assim como encontrado com os

sistemas aqui propostos, nos quais a rigidez interna dificulta a interação entre a formulação e a pele (CARVALHO et al., 2012; SALMAZI et al., 2015).

De modo geral, os resultados obtidos no estudo de bioadesão também não se correlacionaram com os valores de adesividade obtidos no teste TPA, no qual nenhum tipo de pele foi usado. Assim sendo, o uso de pele modificou os valores de adesão, o que revela a importância da simulação de um substrato fisiológico em testes realizados *in vitro*.

Os resultados encontrados indicam que a adição de lipídeos e promotores hidrofílicos de permeação podem não provocar mudanças substanciais na propriedade bioadesiva de formulações e que essa capacidade parece depender do sistema ao qual essa adição é feita.

A presença de CER em fase lamelar composta pelo tensoativo CETETH-10 parece influenciar a bioadesão. A fase lamelar C4CHO foi mais bioadesiva do que o sistema contendo ceramida (C4CHOCER), apesar de possuírem semelhança em relação à coesão e comportamento reológico oscilatório semelhantes. Sugere-se que, essa redução tenha ocorrido pela provável função lubrificante exercida pela CER, o que acabou por reduzir a interação do sistema com a pele. A capacidade redutora de lipídeos em relação à bioadesividade também foi relatada por Oyafuso e colaboradores (2017) ao comparar sistemas líquido cristalinos que diferiam pela fase oleosa empregada. Na presença de uma superfície hidratada, as ligações secundárias responsáveis pela adesão a uma superfície que esteja seca são mais fracas pois precisam atuar em uma distância maior (GERAGHTY et al., 1997). Entretanto, apesar da considerável redução na bioadesão, o sistema C4CHOCER possui ótimas propriedades bioadesivas.

Por outro lado, nos demais sistemas estudados as associações parecem não influenciar esse parâmetro avaliado. A associação de CER no sistema P e a incorporação de cotensoativo dietilenoglicol monoetil éter no sistema T2 manteve as propriedades bioadesivas dos sistemas de modo que os valores encontrados dentro de cada grupo de fases lamelares formadas pelo mesmo tensoativo eram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). Ou seja, o trabalho de bioadesão dos sistemas P e PCER não possuem diferença estatística, assim como o que ocorre com os sistemas T2 e 3T2CoT.

A partir de todos os resultados encontrados, sugere-se, ainda, que o tensoativo empregado na formação das fases lamelares tenham um impacto maior na bioadesão

do que as associações feitas em cada um dos grupos. Sendo assim, existem evidências que confirmam a hipótese de que a composição dos sistemas seja mais importante do que a fase em si, em relação à bioadesão.

De modo geral, as fases lamelares propostas apresentaram valores superiores de trabalho de bioadesão quando comparadas a hidrogeis de ácido poliacrílico (carbopol 971 e carbopol 974) ($p < 0,05$), os quais são hidrogeis tradicionalmente reconhecidos por suas propriedades bioadesivas. Tal comportamento pode aumentar a performance clínica da formulação desenvolvida ao possibilitar maior tempo de contato com a pele e ainda, manter a formulação restrita às lesões da psoríase, reduzindo o contato da formulação com a pele saudável. As exceções foram as fases formadas pelo tensoativo T 701, as quais apresentaram valores inferiores (CALIXTO et al., 2015; CARVALHO et al., 2014).

Por apresentar excelentes propriedades bioadesivas, as mesofases lamelares aqui propostas são boas candidatas a sistemas cutâneos de liberação por possuírem propriedades que favorecem a interação entre seus componentes e as células epidérmicas e ainda, podem otimizar a penetração cutânea de MTX na área afetada pela psoríase e, assim, reduzir a exposição da pele sadia ao fármaco administrado topicamente.

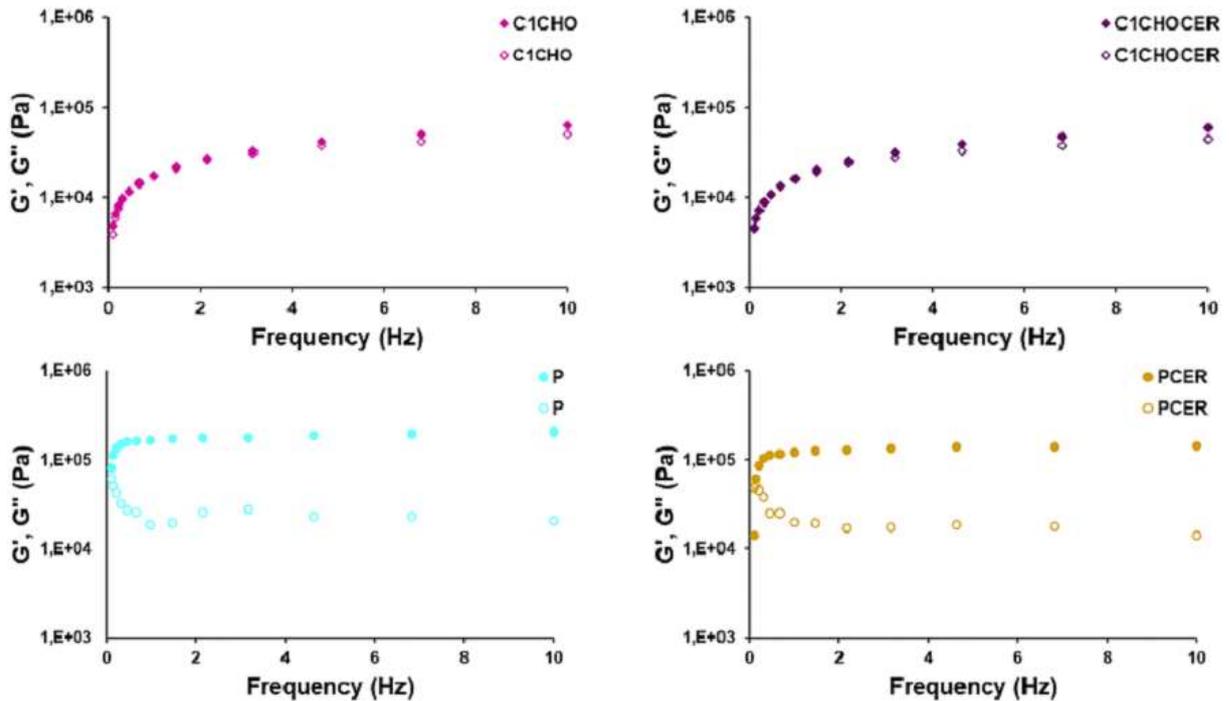
5.9 ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA

A análise reológica oscilatória estabelece a relação entre tensão de cisalhamento e a deformação resultante desta, fornecendo, portanto, informações sobre a viscoelasticidade e a estrutura das amostras estudadas. Obtém-se o módulo elástico ou módulo de armazenamento (G') corresponde à energia armazenada durante o processo de deformação pelo aumento de tensão e a energia liberada pela redução da tensão. Por outro lado, o módulo viscoso ou módulo de perda (G'') representa a energia que não pode ser armazenada, pois a tensão aplicada dissipa-se na forma de deformação irreversível (PÈNZES; CSÓKA; ERŐS, 2004).

A magnitude destes módulos indica, qualitativamente, a estrutura da amostra. Se $G' \gg G''$, sugere-se que o sistema esteja quimicamente ligado, se $G' > G''$, o sistema encontra-se interligado por ligações secundárias e se, $G' < G''$, as moléculas que compõe o sistema estão ligadas por interações físicas (CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIF, 2002; CALLENS et al., 2003).

Portanto, informações adicionais a respeito da estrutura das fases líquido cristalinas lamelares foram obtidas a partir da realização da análise oscilatória das formulações. Curvas típicas do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') em função da frequência aplicada são demonstradas nas Figura 29.

Figura 29 - Reogramas obtidos com as medidas de reologia oscilatória dos sistemas C4CHO, C4CHOCER, P e PCER demonstrando a variação do módulo de armazenamento G' (símbolos cheios) e do módulo de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência.



Fonte: Da autora.

As mesofases lamelares C4CHO, C4CHOCER, P e PCER foram selecionadas para esse estudo por se tratarem de sistemas com características de textura e bioadesão mais atraentes à aplicação cutânea.

Em toda a faixa de frequência estudada, os quatro sistemas mostraram possuir propriedades predominantemente elásticas ($G' > G''$), indicando que a energia armazenada na estrutura das fases lamelares prevalece sobre a energia dissipada, comportamento característico de géis. Este comportamento viscoelástico é comparável com os resultados obtidos para diferentes tipos de fases lamelares (CALVO; RUIZ; VALIENTE, 2016).

De modo geral, as fases lamelares com tensoativo PPG-5-CETETH-10 apresentaram os maiores valores de G' e os menores valores de G'' em comparação com as fases lamelares compostas pelo tensoativo CETETH-10. Sendo assim, a presença de um tensoativo com maior volume da porção hidrofílica (PPG-5-CETETH-

10) parece ter um efeito expressivo no comportamento reológico de fases lamelares, proporcionando sistemas com comportamento mais elástico.

Os efeitos de diferentes composições oleosas na dinâmica dos módulos de armazenamento e de perda também puderam ser estudados, de modo a determinar a influência da associação de CER no comportamento reológico das fases lamelares.

Nos sistemas C4CHO e C4CHOCER, o módulo elástico predomina sobre o módulo viscoso ($G' > G''$) em toda a faixa de frequência aplicada e os valores de ambos os módulos são bastante próximos. Observa-se ainda, que ambos os módulos são dependentes da frequência, assim como já verificado por Makai e colaboradores (2003) ao estudarem outras fases lamelares. Um comportamento reológico bastante semelhante também foi encontrado por Li, Zhao e Wang (2017) ao estudar sistemas lamelares formado por um tensoativo etoxilado com molécula similar ao CETETH-10. Nota-se ainda, que a associação de CER ao sistema parece não ter influência sobre o comportamento reológico, uma vez que os dois reogramas são muito similares e o módulo elástico continua sendo predominante e sendo bastante próximo ao módulo de perda. Assim, a associação de CER na mesofase lamelar parece não influenciar no embalamento dos domínios lamelares e, por isso, uma fase lamelar similar é formada.

Nos sistemas P e PCER, mais uma vez, o módulo elástico predomina sobre o módulo viscoso ($G' > G''$) em toda a faixa de frequência aplicada e o módulo de armazenamento é cerca de uma ordem de magnitude maior que o viscoso em toda a faixa de frequência estudada. Estes resultados são característicos de materiais com comportamento predominantemente elástico, o que sugere que esses sistemas se encontram bem estruturados e existe fortes interações entre as moléculas que os compõem (YARIV et al., 2010). Observa-se ainda, que ambos os módulos são menos dependentes da frequência, assim como já verificado por Németh e colaboradores (1998) ao estudarem outras fases lamelares. A principal diferença entre os reogramas P e PCER, apesar do predomínio do módulo de armazenamento, é que há a diminuição dos valores do comportamento viscosos, e, principalmente elástico, indicando a relativa redução da interação entre os domínios da fase lamelar. A associação de CER na mesofase lamelar parece diminuir o embalamento dos domínios lamelares, aumentando o espaço entre eles e, portanto, favorece a formação de fases lamelares menos estáveis e mais fluidas.

De modo a estabelecer uma análise quantitativa de G' em relação à frequência determinou-se o valor r a partir da regressão linear dos dados numéricos obtidos. Calculou-se também o expoente n através da seguinte equação, o qual indica a estrutura dos sistemas estudados.

$$G' = S \cdot \omega^n$$

Onde G' é o módulo de armazenamento, ω , frequência oscilatória e S , a resistência do gel e n , o expoente viscoelástico.

De acordo com Saxena, Kaloti e Bohidar (2011), os parâmetros S e n indicam a densidade da reticulação no interior da formulação. Elevados valores de S indicam grande reticulação e força da estrutura da amostra. De modo contrário, o valor de n diminui com o aumento da densidade da reticulação e valores baixos indicam estruturas mais fortes. Na Tabela 8 estão listados os parâmetros reológicos, indicando os valores da regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para os sistemas estudados.

Tabela 8 - Valores da regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para os sistemas estudados.

Formulação	r	S	n
C4CHO	0,999	17946	0,542
C4CHOCER	0,999	16626	0,553
P	0,889	155740	0,889
PCER	0,718	97734	0,719

Fonte: Da autora.

Analisando a Tabela 8, observa-se que os valores de S são bastante elevados, sobretudo para as formulações P e PCER, o que corrobora com os gráficos indicativos da Figura 29. Assim sendo, os maiores valores de S encontrados para os sistemas P e PCER indicam fases lamelares mais estruturadas e com fortes interações intermoleculares em comparação com os sistemas C4CHO e C4CHOCER.

Os valores de r das fases lamelares C4CHO e C4CHOCER próximos a 1 indicam que os sistemas são extremamente dependentes da frequência angular aplicada ao contrário dos outros dois sistemas estudados, que possuem valores de r menores, o que revela uma diminuição da frequência.

A associação de CER ao sistema P provoca uma redução do valor de S , indicando, assim como observado no item no perfil de textura, que a associação de CER ao sistema P reduz a compressibilidade do sistema, favorecendo a formação de fases lamelares um menos organizadas.

Apesar de a associação de CER ao sistema C4CHO ter promovido uma discreta redução do valor de S , esse efeito parece não ser tão pronunciado quanto o observado nos sistemas P e PCER, de modo que os sistemas apresentaram compressibilidade bastante semelhantes, conforme observado no item no perfil de textura e reogramas muito similares.

Sendo assim, o estudo reológico é uma técnica importante que fornece informações a respeito da viscoelasticidade de sistemas líquido cristalinos fundamental no desenvolvimento de formulações tópicas, as quais estão diretamente relacionadas com o desempenho da utilização dessas preparações.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o comportamento reológico varia de forma mais pronunciada de acordo com o tensoativo empregado na fase lamelar, e, para um mesmo tensoativo, esse comportamento pode variar ligeiramente com a associação de CER. Sendo assim, as fases lamelares contendo tensoativo CETETH-10 foram as que apresentaram um equilíbrio entre comportamento elástico e viscoso, sendo sistemas organizados mais interessantes para administração tópica.

5.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROMOTOR *IN VITRO* DE MESOFASES LAMELARES ASSOCIADAS A LIPÍDEOS FISIOLÓGICOS

A hidrossolubilidade, o peso molecular e o estado dissociado em pH fisiológico limitam a difusão do MTX no EC e sua penetração nas camadas viáveis da pele (AMARIJI et al., 2016; MCCULLOUGH et al., 1976; POE, 1977; TROTTA et al., 2004; VAIDYANATHAN; CHAUBAL; VASAVADA, 1985).

Assim sendo, estratégias que possibilitem uma modificação reversível na barreira exercida pelo EC podem permitir a penetração do fármaco e seu uso para o tratamento de diferentes doenças cutâneas, como a psoríase.

Nesse sentido, os sistemas líquido cristalinos foram avaliados frente à sua capacidade *in vitro* de promover a penetração do corante fluorescente sulforodamina B, um substituto de fármacos hidrofílicos (KÜCHLER et al., 2009), para presumir a distribuição do fármaco no substrato cutâneo após 1, 6 e 12 horas de tratamento.

As mesofases lamelares C4CHO e C4CHOCER foram selecionadas para esse estudo por se tratarem de sistemas com características de textura, bioadesão e comportamento reológico mais atraentes à aplicação cutânea. Como controle foi usada uma emulsão convencional obtida pela associação de CER e CHO à uma emulsão obtida do diagrama 1. A nomenclatura e a composição dos sistemas selecionados, portanto, para esse estudo, estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Nomenclatura e composição (%p/p) das fases lamelares e controle usados no estudo de avaliação do efeito promotor *in vitro*.

Formulação	Composição (% p/p)				
	Ácido esteárico	Colesterol	Ceramida 3	CETETH-10	Água
C4CHO	7,0	3,0	0,0	60,0	30,0
C4CHOCER	6,3	2,7	1,0	60,0	30,0
Controle	6,3	2,7	1,0	40,0	50,0

Fonte: Da autora.

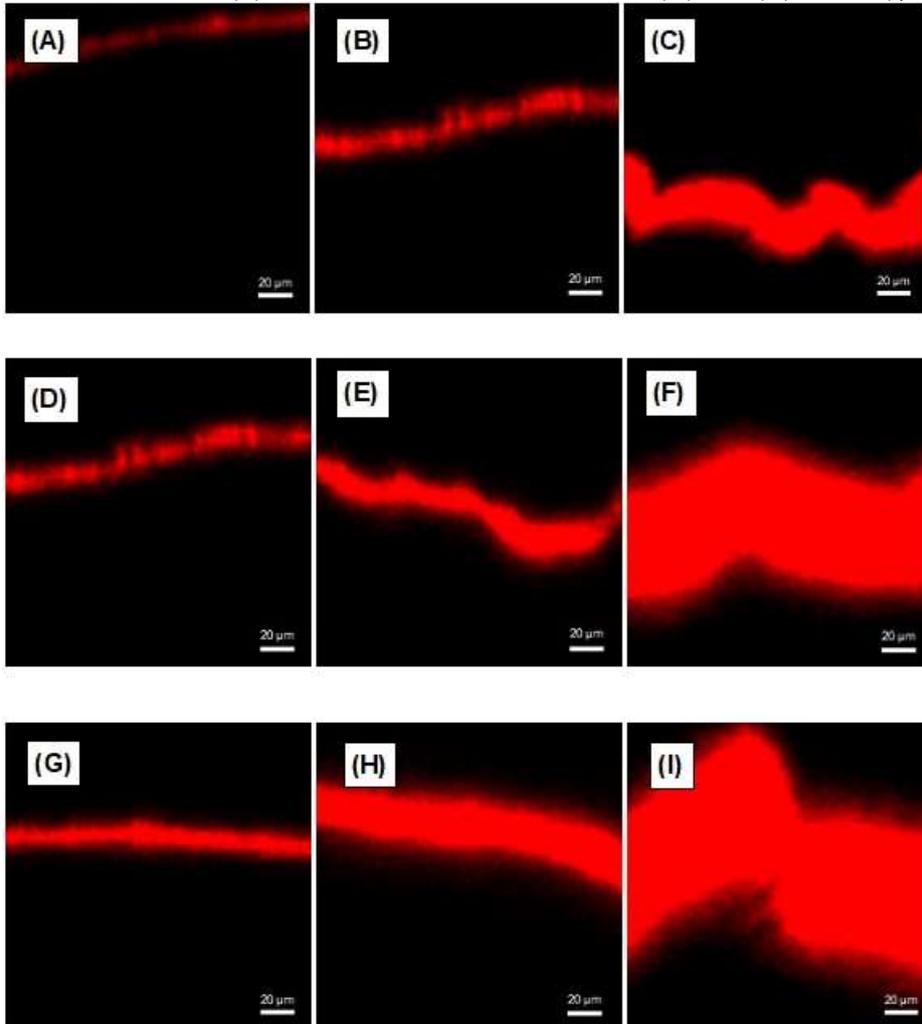
Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) (Figura 30) demonstram a intensidade da fluorescência no tecido cutâneo após 1,6 e 12 horas quando a sulforodamina B foi aplicada usando controle (Figura 30A-C), C4CHO (Figura 30D-F) e C4CHOCER (Figura 30G-I).

Observa-se que, independentemente da formulação utilizada, há um aumento gradual da intensidade da fluorescência nas camadas cutâneas de acordo com o tempo. Esses resultados indicam que todas as formulações estudadas foram eficientes em aumentar a penetração cutânea do marcador fluorescente.

Quando a emulsão convencional contendo sulforodamina B foi aplicada na pele, observou-se, nas imagens obtidas por MCVL, que o marcador fluorescente é mais retido na camada superior da pele, ou seja, no EC (Figura 30A-C).

Entretanto, uma tendência diferente foi claramente observada com a aplicação de fases lamelares na pele, com os quais observou-se, na MCVL, uma maior e mais profunda penetração do marcador fluorescente em comparação com controle (Figura 30D-I), mesmo que a emulsão convencional tenha as três principais classes de LF.

Figura 30 - Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser representando a fluorescência do marcador hidrofílico fluorescente sulfurodamina B no estrato córneo, epiderme viável e derme superior determinada a cada tempo pré-estabelecido após a aplicação de controle: 1 h (A), 6 h (B) e 12 h (C), fase lamelar C4CHO: 1 h (D), 6 h (E) e 12 h (F) e fase lamelar C4CHOCER: 1 h (G), 6 h (H) e 12 h (I). Barra de escala: 20µm.



Fonte: Da autora.

O aumento da penetração proporcionado pelas formulações líquido cristalinas pode estar relacionado com:

- Presença de promotor de permeação cutânea na formulação (tensoativo e CHO), o qual tem a propriedade de promover uma alteração reversível na função de barreira exercida pelo EC (ASHTON; HADGRAFT; STEVENS, 1986, BOIKO et al., 2013).

- Organização dos componentes da formulação na forma de cristal líquido. Estudos têm demonstrado que devido a estrutura similar ao EC, a nanoestrutura dos sistemas líquido cristalinos lamelares têm a capacidade de interagir com os lipídeos intercelulares no EC, o que o torna mais fluido e permeável (AYETEKIN et al., 2013;

HOSMER; STEINER; LOPES, 2013; LI et al., 2016). Supõe-se que os domínios hidrofílicos desses sistemas provoquem um aumento do volume interlamelar das bicamadas lipídicas e, portanto, sua desorganização (HÖLLER, VALENTA, 2007).

- Eficiência na hidratação cutânea. Cristais líquidos tem a propriedade de fornecer oclusão cutânea e assim, possibilitarem uma redução da perda de água transdérmica em comparação com emulsões convencionais, sendo, portanto, hidratantes efetivos (IWAJ; FUKASAWA; SUZUKI, 1998).

A presença de sulforodamina B nas fases lamelares aumentou sua penetração nas camadas da pele, alcançando a epiderme viável após 6 horas e a derme superior após 12 horas de tratamento.

Apesar de ambas as fases lamelares terem sido mais eficientes em aumentar a penetração cutânea do marcador fluorescente, C4CHOCER foi ainda mais eficiente nesse sentido, nos três tempos avaliados. O aumento da penetração cutânea com o uso de C4CHOCER reflete então o efeito da presença de CER em fases lamelares em propiciar a presença de um promotor adicional (CER) e a completa composição em relação às três classes de lipídeos fisiológicos na matriz lipídica córnea, a qual poderia favorecer ainda mais a interação com a pele e, portanto, torna-lo mais permeável.

Como estudos têm demonstrado que o sítio de ação do MTX na psoríase é a epiderme (BALL; MCCULLOUGH; WEINSTEIN, 1982; SINGKA et al., 2010), as fases lamelares aqui propostas, com particular destaque para a C4CHOCER possuem potencial aplicação para veiculação tópica do fármaco com concomitante aumento da penetração cutânea uma vez que foi detectada a presença do marcador hidrofílico na epiderme viável e na derme superior, o que demonstra o efeito promotor das fases lamelares para a penetração de substâncias hidrofílicas.

Assim sendo, a composição de um sistema não é o único fator determinante para o aumento da penetração cutânea de substâncias, sendo necessário também observar a presença ou ausência de cristais líquidos, nesse estudo, fases lamelares. Portanto as fases lamelares propostas se apresentam como potenciais estratégias para modificar de modo reversível a barreira exercida pelo EC de modo a possivelmente favorecer a penetração de substâncias hidrofílicas, tais como o MTX, e seu uso no tratamento tópico da psoríase, especialmente com a associação das três classes de lipídeos fisiológicos cutâneos.

6 CONCLUSÃO

Através da construção dos diagramas ternários de fases combinando ácido esteárico, água, CETETH-10, PPG-5-CETETH-20 ou T 701 foi possível delimitar regiões de formação de sistemas líquido cristalinos, já com uma classe de lipídeo fisiológico. As análises de microscopia de luz polarizada possibilitaram a identificação de fases cúbicas, hexagonais e lamelares formadas nesses diagramas ternários.

A associação de ácido oleico aos sistemas selecionados manteve as mesofases líquido cristalinas anteriormente formadas, mas possibilitaram a formação de sistemas visualmente menos viscosos.

A associação de dietilenoglicol monoetil éter a alguns dos sistemas selecionados possibilitou a incorporação de uma molécula com potencial efeito promotor de penetração cutânea de MTX sem transformação de fase com concomitante controle da viscosidade visual.

A associação de colesterol aos sistemas selecionados propiciou a transformação de fases devido à interação dessa molécula com cada um dos tensoativos estudados. Essa foi a primeira das associações que permitiu a formação de fase lamelar a partir de fase hexagonal (possivelmente por ter agido como cotensoativo) e ainda permitiu a incorporação de mais uma classe de lipídeo fisiológico.

A associação de ceramida 3 aos sistemas selecionados manteve a mesofase de fases lamelares anteriormente formadas (possivelmente por agir como um estabilizador dessa fase) e possibilitou a formação de um sistema com as três classes de lipídeos fisiológicos na mesma organização da matriz lipídica córnea, objetivo desse trabalho e que possui potencial para tratar desordens cutâneas em que a barreira esteja comprometida.

As fases lamelares selecionados, além de serem de baixa execução e baixo custo, possibilitaram a incorporação de MTX na concentração de 1%.

O ensaio de perfil de textura demonstrou que, de modo geral, as fases lamelares mais coesas são também mais adesivas e menos compressíveis e possuem características compatíveis com a via cutânea de administração.

As fases lamelares com tensoativo PPG-5-CETETH-20 são mais bioadesivas do que as contendo CETETH-10 e estas são mais adesivas que as com T 701. A

presença de ceramida 3 pode reduzir a característica de bioadesão, mas os sistemas, de modo geral, apresentaram valores bioadesivos ideais.

A análise reológica demonstrou que todas as fases lamelares apresentaram comportamento predominantemente elástico e que os sistemas formados por CETETH-10 possuem reticulação menos densa, com módulo de armazenamento de perda próximos e, por isso, facilitam a aplicação tópica.

A utilização de sistemas líquido cristalinos permitiu maior penetração cutânea de sulforodamina B em comparação com solução e emulsão convencional. Dentre as fases lamelares estudadas, a que possuía a associação das três classes de lipídeos fisiológicos foi a mais efetiva, demonstrando a importância da associação lipídica e da organização líquido cristalina e a provável ação promotora de penetração da ceramida 3.

Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que as fases lamelares desenvolvidas são sistemas de base nanotecnológica promissores para o tratamento tópico da psoríase ao possibilitar duas estratégias simultâneas: a administração de lipídeos cutâneos em sistemas líquidos cristalinos organizados de modo similar ao espaço intercelular do estrato córneo e o tratamento farmacológico com metotrexato.

REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, A. A.; ABOUGHALY, M. H. H. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis: Application of Box–Behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study. **Int. J. Pharm.**, v. 485, n. 1-2, p. 235-243, 2015.
- AL-AHMADY, Z. S.; SCUDAMORE, C. L.; KOSTARELOS, K. Triggered doxorubicin release in solid tumors from thermosensitive liposome-peptide hybrids: Critical parameters and therapeutic efficacy. **Int. J. Cancer**, v. 137, n. 3, p. 731-743, 2015.
- ALAM, M. M.; ARAMAKI, K. Hexagonal phase based gel-emulsion (O/H1 gel-emulsion): Formation and rheology. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12253-12259, 2008.
- ALI, M. F. M. et al. Liposomal Methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: Preparation, characterization and laser targeting. **Med. Sci. Monit.**, v. 14, n. 12, p. PI66-PI74, 2008.
- ALMGREN, M. et al. Dispersed lipid liquid crystalline phases stabilized by a hydrophobically modified cellulose. **Langmuir**, v. 23, n. 5, p. 2768-2777, 2007.
- ALVAREZ-FIGUEROA, M. J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v. 215, n. 1, p. 57-65, 2001.
- ALVAREZ-FIGUEROA, M. J.; DELGADO-CHARRO, M. B.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. **Int. J. Pharm.**, v. 212, n. 1, p. 101-107, 2001.
- ALVAREZ-RUEDA, N. et al. Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 7, p. 1680-1690, 2007.
- ALMEIDA, M. et al. Polaxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. **J. Polym. Res.**, v. 25, n. 1, p. 31, 2018.
- AMARIJI, B. et al. Microemulsions mediated effective delivery of methotrexate gel: more than a tour force in psoriasis therapeutics. **J. Drug Target.**, v. 24, n. 2, p. 147-160, 2016.
- AMAR-YULI, I. et al. Low Viscosity Reversed Hexagonal Mesophases Induced by Hydrophilic Additives. **J. Phys. Chem. B**, v. 112, n. 13, p. 3971-3982, 2008.
- AMIDON, G. et al. Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ANDERSON, D. M.; GRUNER, S. M.; LEIBLER, S. Geometrical aspects of the frustration in the cubic phases of lyotropic liquid crystals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 15, p. 5364-5368, 1988.

ANDREWS, S. N.; JEONG, E.; PRAUSNITZ, M. R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. **Pharm. Res.**, v. 30, n. 4, p. 1099-1109, 2013.

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

AUNGST, B. J. Structure/Effect Studies of Fatty Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers and Skin Irritants. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 3, p. 244-247, 1989.

ARMSTRONG, A. W. et al. Quality of Life and Work Productivity Impairment among Psoriasis Patients: Findings from the National Psoriasis Foundation Survey Data 2003–2011. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e52935, 2012.

ATEF, E.; ALTUWAIJRI, N. Using Raman Spectroscopy in Studying the Effect of Propylene Glycol, Oleic Acid, and Their Combination on the Rat Skin. **AAPS PharmSciTech.**, v. 19, n. 1, p. 114-122, 2018.

AVASATTHI, V. et al. A novel nanogel formulation of methotrexate for topical treatment of psoriasis: optimization, in vitro and in vivo evaluation. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 21, n. 5, p. 554-562, 2016.

AYETEKIN, M. et al. Formulation and characterization of liquid crystal systems containing azelaic acid for topical delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 39, n. 2, p. 228-239, 2013.

AZAGURY, A. et al. The synergistic effect of ultrasound and chemical penetration enhancers on chorioamnion mass transport. **J. Control. Release**, v. 200, p. 35-41, 2015.

BAGGOTT, J. E.; VAUGHN, W. H.; HUDSON, B. B. Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. **Biochem. J.**, v. 236, n. 1, p. 193-200, 1986.

BAKER, B. S.; FRY, L. The immunology of psoriasis. **Br. J. Dermatol.**, v. 126, n. 1, p. 1-9, 1992.

BALL, M. A.; MCCULLOUGH, J. L.; WEINSTEIN, G. D. Percutaneous absorption of methotrexate: effect on epidermal DNA synthesis in hairless mice. **J. Investig. Dermatol.**, v. 79, n. 1, p. 7-10, 1982.

BENDER, J. et al. Lipid cubic phases for improved topical drug delivery in photodynamic therapy. **J. Control. Release**, v. 106, n. 3, p. 350-360, 2005.

BENSON, H. A. E. Skin Structure, Function, and Permeation. In: BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2012, p. 3-22.

BERARDESCA, E. et al. Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study. **Contact Dermatitis**, v. 45, n. 5, p. 280-285, 2001.

BARKER, J. et al. Assessment and management of methotrexate hepatotoxicity in psoriasis patients: report from a consensus conference to evaluate current practice and identify key questions toward optimizing methotrexate use in the clinic. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 25, n. 7, p. 758-764, 2011.

BESSAR, H. et al. Funcionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. **Colloids Surf. B**, v. 141, p. 141-147, 2016.

BLANK, I. H. Cutaneous barriers. **J. Investig. Dermatol.**, v. 45, n. 4, p. 249-256, 1965.

BOEHNCKE, W-H.; SCHÖN, M. **Psoriasis**. *Lancet*, v. 386, n. 9997, p. 983-994, 2015.

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid. **Langmuir**, v. 17, n. 25, p. 7742-7751, 2001.

BOIKO, Y. A. et al. Effects of Liquid Crystal Systems Based on Cholesterol Esters on Skin Permeability. **Pharm. Chem. J.**, v. 47, n. 7, p. 393-396, 2013.

BOUWSTRA, J. A. et al. Cholesterol sulfate and calcium affect stratum corneum lipid organization over a wide temperature range. **J. Lipid Res.**, v. 40, n. 12, p. 2303-2312, 1999.

BOUWSTRA, J. A. et al. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. **J. Lipid Res.**, v. 39, n. 1, p. 186-196, 1998.

BOUWSTRA, J. A. et al. The Lipid Organisation in the Skin Barrier. **Acta Derm. Venereol.**, n. 208, p. 23-30, 2000.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, n. 12, p. 2080-2095, 2006.

BOYD, B. J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 309, n. 1, p. 218-226, 2006.

BRADY, S. P. Parakeratosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 50, n. 1, p. 77-84, 2004.

BRAIN, K. R. et al. The influence of Azone® on the percutaneous absorption of methotrexate. **Int. J. Pharm.**, v. 71, n. 3, p. R9-R11, 1991.

BRAVERMAN, I. M.; YEN, A. Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 68, n. 1, p. 53-60, 1977.

BREATHNACH, A. S. et al. Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. **J. Anat.**, v. 114, n. Pt 1, p. 65-81, 1973.

BYAMBA, D. et al. Skin-penetrating methotrexate alleviates imiquimod-induced psoriasis form dermatitis via decreasing IL-17-producing gamma delta T cells. **Exp. Dermatol.**, v. 23, n. 7, p. 492-496, 2014.

BYUN, H. J. et al. Lipid ingredients in moisturizers can modulate skin responses to UV in barrier-disrupted human skin in vivo. **J. Dermatol. Sci.**, v. 65, n. 2, p. 110-117, 2012.

CALLENS, C. et al. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, n. 3, p. 323-328, 2003.

CALIXTO, G. et al. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: Preparation and characterization. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 20, n. 4, p. 409-496, 2015.

CALVO, D.; RUIZ, J. L.; VALIENTE, M. Phase equilibria of mixtures of surfactants and viscoelastic properties of the liquid crystal phases. Phase equilibria of mixtures of surfactants and viscoelastic properties of the liquid crystal phases. **Fluid Phase Equilib.**, v. 425, p. 358-364, 2016.

CAO, X. et al. Aggregation of poly (ethylene oxide)– poly (propylene oxide) block copolymers in aqueous solution: DPD simulation study. **J. Phys. Chem. A**, v. 109, n. 45, p. 10418-10423, 2005.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina**. 2012. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

CARVALHO, F. C. et al. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CARVALHO, F. C. et al. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2012.

CARVALHO, F. C. et al. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010.

CASTRO, G. A. et al. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. **J. Microencapsul.**, v. 24, n. 5, p. 395-407, 2007.

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The Use of Xanthan Gum in an Ophthalmic Liquid Dosage Form: Rheological Characterization of the Interaction with Mucin. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 4, p. 1117-1127, 2002.

CHAMLIN, S. L. et al. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: Changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 47, n. 2, p. 198-208, 2002.

CHAPKIN, R. S. et al. Metabolism of essential fatty acids by human epidermal enzyme preparations: evidence of chain elongation. **J. Lipid Res.**, v. 27, n. 9, p. 945-954, 1986.

CHLADEK, J. et al. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 53, n. 6, p. 437-444, 1998.

CHOI, E-H. et al. Mechanisms by Which Psychologic Stress Alters Cutaneous Permeability Barrier Homeostasis and Stratum Corneum Integrity. **J. Investig. Dermatol.**, v. 124, n. 5, p. 587-595, 2005.

CHRISTOPHERS, E.; KLIGMAN, A. M. Visualization of the cell layers of the stratum corneum. **J. Investig. Dermatol.**, v. 42, p. 407-409, 1964.

CHUNG, H.; CAFFREY, M. The curvature elastic-energy function of the lipid-water cubic mesophase. **Nature**, v. 368, n. 6468, p. 224, 1994.

CINTRA, G. A. S. et al. Bioadhesive Surfactant Systems for Methotrexate Skin Delivery. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 231, 2016.

CLAPPER, J. D.; IVERSON, S. L.; GUYMON, C. A. Nanostructured Biodegradable Polymer Networks Using Lyotropic Liquid Crystalline Templates. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2104-2111, 2007.

CLOGSTRON, J.; CAFFREY, M. Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids. **J. Control. Release**, v. 107, n. 1, p. 97-111, 2005.

CLOGSTRON, J. et al. Controlling release from the lipidic cubic phase by selective alkylation. **J. Control. Release**, v. 102, n. 2, p. 441-461, 2005.

CODERCH, L. et al. Efficacy of stratum corneum lipid supplementation on human skin. **Contact Dermatitis**, v. 47, n. 3, p. 139-146, 2002.

COLEMAN, N. R. B.; ATTARD, G. S. Ordered mesoporous sílicas prepared from both micellar solutions and liquid crystal phases. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 44, p. 73-80, 2001.

COMAISH, S.; JUHLIN, L. Site of action of methotrexate in psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 100, n. 1, p. 99-105, 1969.

CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 6, p. 2675-2682, 1993.

DALRYMPLE, J. M. et al. Pharmacokinetics of Oral Methotrexate in Patients With Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 11, p. 3299-3308, 2008.

DALY, C. H. Biomechanical Properties of Dermis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 79, n. 1, p. 17-20, 1982.

DE GENNES, P. G.; TAUPIN, C. Microemulsions and the Flexibility of Oil/Water Interfaces. **J. Phys. Chem.**, v. 86, n. 13, p. 2294-2304, 1982.

DE PAEPE, K. et al. Incorporation of ceramide 3B in dermatocosmetic emulsions: effect on the transepidermal water loss of sodium lauryl sulphate-damaged skin. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 14, n. 4, p. 272-279, 2000.

DE PAEPE, K.; ROSEEUW, D.; ROGIERST, V. Repair of acetone-and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 16, n. 6, p. 587-594, 2002.

DEPIERI, L. V. et al. RNAi mediated IL-6 in vitro knockdown in psoriasis skin model with topical siRNA delivery system based on liquid crystalline phase. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 105, p. 50-58, 2016.

DING, Y.; CHEN, L.; GUO, R. Preparation of zinc gluconate nanostructures with different shapes by lamellar liquid crystal template. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 295, n. 1-3, p. 85-90, 2007.

DOGRA, S.; KRISHNA, V.; KANWAR, A. J. Efficacy and safety of systemic methotrexate in two fixed doses of 10 mg or 25 mg orally once weekly in adult patients with severe plaque-type psoriasis: a prospective. **Clinical Exp. Dermatol.**, v. 37, n. 7, p. 729-734, 2012.

DONG, Y. D. et al. Bulk and dispersed aqueous phase behavior of phytantriol: effect of vitamin E acetate and F127 polymer on liquid c9 rystal nanostructure. **Langmuir**, v. 22, n. 23, p. 9512-9518, 2006.

DOOREN-GREEBER. J. et al. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. **Br. J. Dermatol.**, v. 130, n. 2, p. 204-210, 1994.

DUBEY, V. et al. Dermal and transdermal delivery of an agente anti-psoriatic agente via ethanolic liposomes. **J. Control. Release**, v. 123, n. 2, p. 148-154, 2007.

DUBEY, V. et al. Novel methothrexate-based topical therapies for effective treatment of psoriasis. **Clin. Dermatol.**, v. 24, p. 124-130, 2008.

DUE, E. et al. Discontinuation of Methotrexate in Psoriasis. **Acta Derm. Venereol.**, v. 92, n. 4, p. 353-354, 2012.

DUNCKE, A. C. P. et al. Liquid Crystal Observations in Emulsion Fractions from Brazilian Crude Oils by Polarized Light Microscopy. **Energy Fuel**, v. 30, n. 5, p. 3815-3820, 2016.

ECCLESTON, G. M. et al. Synchrotron X-ray investigations into the lamellar gel phase formed in pharmaceutical creams prepared with cetrimide and fatty alcohols. **Int. J. Pharm.**, v. 203, n. 1-2, p. 127-139, 2000.

EDMUNDSON, W. F.; GUY, W. B. Treatment of Psoriasis with Folic Acid Antagonists. A. M. A. **Arch. Dermatol.**, v. 78, n. 2, p. 200-203, 1958.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. **Clin. Dermatol.**, v. 13, n. 4, p. 375-380, 1995.

EGHILEB, A. M.; DAVIES, E. E. G.; FINLAY, A. Y. Psoriasis has a major secondary impact on the lives of family members and partners. **Br. J. Dermatol.**, v. 156, n. 6, p. 1245-1250, 2007.

ELANGO, T. et al. Methotrexate treatment provokes apoptosis of proliferating keratinocyte in psoriasis patients. **Clin. Exp. Med.**, v. 17, n. 3, p. 371-381, 2017.

ELANGO, T. et al. Serum interleukin-6 levels in response to methotrexate treatment in psoriatic patients. **Clin. Chim. Acta**, v. 413, n. 19-20, p. 1652-1656, 2012.

ELIAS, P. M. et al. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. **J. Clin. Invest.**, v. 74, n. 4, p. 1414-1421, 1984.

ELIAS, P. M. et al. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. **BBA-MOL CELL BIOL L.**, v. 1841, n. 3, p. 353-361, 2014.

ELIAS, P. M. et al. The epidermal lamellar body as a multifunctional secretory organelles. In: **Skin barrier**. Nova York: Taylor & Francis, 2006, p. 261-272.

ESKICIRAK, B.; ZEMHERI, B.; CERKEZOGLU, A. The treatment of psoriasis vulgaris: 1% topical methotrexate gel. **Int. J. Dermatol.**, v. 45, n. 8, p. 965-969, 2006.

ESUMI, K.; UENO, M. (Ed.). **Structure-performance relationships in surfactants**. Flórida: CRC Press, 2003.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. Nova York: Marcel Dekker, 1999.

FAIRHURST, C. E. et al. Lyotropic surfactant liquid crystals. In: DEMUS, D. et al. (Org.). **Handbook of Liquid Crystals**. Nova Iorque: Wiley-VCH, 1998.

FARBER, S. et al. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). **N. Engl. J. Med.**, v. 238, n. 23, p. 777-7793, 1948.

FARWANAH, H. et al. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 296, n. 11, p. 514-521, 2005.

FEIGENSON, G. W.; BUBOLTZ, J. Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Dilauroyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. **Biophys. J.**, v. 80, n. 6, p. 2775-2788, 2001.

FERREIRA, M. et al. Methotrexate loaded lipid nanoparticles for topical management of skin-related diseases: Design, characterization and skin permeation potential. **Int. J. Pharm.**, v. 512, n. 1, p. 14-21, 2016.

FERREIRA, M. et al. Topical co-delivery of methotrexate and etanercept using lipid nanoparticles: A target approach for psoriasis management. **Colloids Surf. B Bionterfaces**, v. 159, p. 23-29, 2017.

FIROUZI, A. et al. Alkaline Lyotropic Silicate - Surfactant Liquid Crystals. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, n. 15, p. 3596-3610, 1997.

FISCHER, H. et al. DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. **J. Investig. Dermatol.**, v. 127, n. 1, p. 24-30, 2007.

FLEISCHMAJER, R.; PERLISH, J. S.; BASHEY, R. I. Human dermal glycosaminoglycans and aging. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 279, n. 2, p. 265-275, 1972.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003.

FLUHR, J. W.; CAVALLOTTI, C.; BERARDESCA, E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. **Clin. Dermatol.**, v. 26, n.4, p. 380-386, 2008.

FONTELL, K. et al. Phase equilibria and structures in ternary systems of a cationic surfactant ($C_{16}TABr$ or $(C_{16}TA)_2SO_4$), alcohol, and water. **Colloid Polym. Sci.**, v. 269, n. 7, p. 727-742, 1991.

FONTES, M. L. et al. Effect in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate released properties. **Carbohydr. Polym.**, v. 179, n. 1, p. 126-134, 2018.

FORGÁCS, E. et al. Interaction Between Cholesterol and Non-ionic Surfactants Studied by Thin-Layer Chromatography. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 27, n. 13, p. 1981-1992, 2004.

FRANCOEUR, M. L.; GOLDEN, G. M.; POTTS, R. O. Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans) dermal drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 7, n. 6, p. 621-627, 1990.

FREDRIKSSON, T.; PETTERSSON, U. Severe psoriasis—oral therapy with a new retinoid. **Dermatology**, v. 157, n. 4, p. 238-244, 1978.

FUCHS, E. Epidermal differentiation – the bare essentials. **J. Cell Biol.**, v. 111, n. 6, p. 2807-2814, 1990.

FUJIMURA, A. T. et al. Resveratrol-loaded Liquid Crystalline System Inhibits UVB-Induced skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 5, p. 1329-1338, 2016.

GABRIEL, J-C. P. et al. Swollen liquid-crystalline lamellar phase based on extended solid-like sheets. **Nature**, v. 413, n. 6855, p. 504, 2001.

GARCIA, M. T. J. et al. Improvement of cutaneous delivery of methylene blue by liquid crystals. **Int. J. Pharm.**, v. 548, n. 1, p. 454-465, 2018.

GERAGHTY, P. B. et al. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. **Biomaterials**, v. 18, n. 1, p. 63-67, 1997.

GHADIALLY, R.; HALKIER-SORENSEN, L.; ELIAS, P. M. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 26, n. 3, p. 387-396, 1992.

GHADIALLY, R.; REDD, J. T.; ELIAS, P. M. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 107, n. 4, p. 558-564, 1996.

GOLDSMITH, L. A. My organ is bigger than your organ. **Arch. Dermatol.**, v. 126, n. 3, p. 301-302, 1990.

GOLDSTEIN, A. M.; ABRAMOVITS, W. Ceramides and the stratum corneum: structure function, and new methods to promote repair. **Int. J. Dermatol.**, v. 42, n. 4, p. 256-259, 2003.

GOODBY, J. W. et al. **Handbook of Liquid Crystals**, v. 1. Berlin: Wiley-VCH, 1998. p. 17-23.

GRAY, G. M. et al. Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of pig epidermis. **Br. J. Dermatol.**, v. 106, n. 1, p. 59-63, 1982.

GREEN, J. et al. Tetronic 701 – A novel hypocholesterolemic agent. **Atherosclerosis**, v. 23, n. 3, p. 549-558, 1976.

GRIFFITHS, C. E. M.; BARKER, J. N. W. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 263-271, 2007.

GROEN, D. et al. Two new methods for preparing a unique stratum corneum substitute. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 10, p. 2421-2429, 2008.

GUBNER, R. Effect of "Aminopterin" on epithelial tissues. **AMA Arch. Derm. Syphilol.**, v. 64, n. 6, p. 688-699, 1951.

GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discov. Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1032-1040, 2010.

GUPTA, A. K. et al. Keratoses in patients with psoriasis: A prospective study in fifty-two inpatients. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 23, n. 1, p. 52-55, 1990.

GUTTMAN-YASSKY, E.; NOGRALES, K. E.; KRUEGER, J. G. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—Part I: clinical and pathologic concepts. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 127, n. 5, p. 1110-1118, 2011.

GYULAI, R. et al. Current practice of methotrexate use for psoriasis: results of a worldwide survey among dermatologists. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 29, n. 2, p. 224-231, 2015.

HALKIER-SORENSEN, L. Occupational skin diseases. **Contact Dermatitis**, v. 35, n.1, p.1-120, 1996.

HANNUN, Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 5, p. 3125-3128, 1994.

HARDING, C. R.; BARTOLONE, J.; RAWLINGS, A. V. Effects of Natural Moisturizing Factor and Lactic Acid Isomers on Skin Function. In: LODÉN. M.; MAIBACH, H. I. **Dry Skin and Moisturizers**. Nova York: CRC Press, 2000, 229-242.

HAUSTEIN, U. F.; RYTTER, M. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 14, n. 5, p. 382-380, 2000.

HEENEN, M. et al. Methotrexate induces apoptotic cell death in human keratinocytes. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 290, n. 5, p. 240-245, 1998.

HEIMBURG, T. et al. Phase transition from a gel to a fluid phase of cubic symmetry in dimyristoylphosphatidylcholine/myristic acid (1: 2, mol/mol) bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1025, n. 1, p. 77-81, 1990.

HELD, F.; LUND, H.; AGNER, T. Effect of different moisturizers on SLS-irritated human skin. **Contact Dermatitis**, v. 44, n. 4, p. 229-234, 2001.

HENRIKSEN, I. et al. Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study. **Int. J. Pharm.**, v. 145, n. 1-2, p. 231-240, 1996.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 11, p. 85-97, 1960.

HÖLLER, S.; VALENTA, C. Effect of selected fluorinated drugs in a “ringing” gel on rheological behaviour and skin permeation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 66, n. 1, p. 120-126, 2007.

HOLMBERG, K. et al. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2002.

HUANG, H-C.; CHANG, T-M. Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin. **Int. J. Dermatol.**, v. 47, n. 8, p. 812-819, 2008.

HWANG, G. C. et al. Development and optimization of a methotrexate topical formulation. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 21, n. 17, p. 1941-1952, 1995.

HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. Nova York: Wiley-VCH, 2001.

ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 14, n. 3, 1997.

IMOKAWA, G. et al. Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramides. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 40, n. 5, p. 273-285, 1989.

ISRAELACHIVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2011.

ISRAELACHIVILI, J. N. The Science and applications of emulsions – an overview. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v.91, p. 1-8, 1994.

ISRAELACHIVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Billayers. **J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2**, v. 72, p. 1525-1568, 1976.

ITO, T. et al. Two-step emulsification process for water-in-oil-in-water multiple emulsions stabilized by lamellar liquid crystals. **J. Oleo Sci.**, v. 61, n. 8, p. 413-420, 2012.

IWAI, H.; FUKASAWA, J.; SUZUKI, T. A liquid crystal application in skin care cosmetics. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 20, n. 2, p. 87-102, 1998.

IWAI, H.; FUKASAWA, J.; SUZUKI, T. Successful incorporation of pseudo-ceramides into emulsions at effective concentrations. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 189, n. 2, p. 288-293, 1997.

JAKASA, I. et al. Increased permeability for polyethylene glycols through skin compromised by sodium lauryl sulphate. **Exp. Dermatol.**, v. 15, n. 10, p. 801-807, 2006.

JAVADZADEH, Y.; HAMISHEHKAR, H. Enhancing percutaneous delivery of methotrexate using different types of surfactants. **Colloid Surf. B Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 422-426, 2011.

JEFFES, E. W. B. et al. Methotrexate therapy of psoriasis: differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelial cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate. **J. Investig. Dermatol.**, v. 104, n. 2, p. 183-188, 1995.

JHONSTON, A. et al. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecule. **Clin. Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 154-163, 2005.

JONES, D. S. et al. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Release**, v. 67, n. 2-3, p. 357-368, 2000.

JONES, D. S. et al. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: in vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **J. Control. Release**, v. 49, n. 1, p. 71-79, 1997.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 151, n. 2, p. 223-233, 1997.

JOLIVET, J. et al. Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. **N. Engl. J. Med.**, v. 309, n. 18, p. 1094-1104, 1983.

JUPING, W. et al. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. **Int. J. Pharm.**, v. 251, n. 1-2, p. 13-21, 2003.

KAASGAARD, T.; DRUMMOND, C. J. Ordered 2-D and 3-D nanostructured amphiphile self-assembly materials stable in excess solvent. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 8, n. 43, p. 4957-4975, 2006.

KANEKO, F.; YANO, J.; SATO, K. Diversity in the fatty-acid conformation and chain packing of cis-unsaturated lipids. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 8, n. 4, p. 417-425, 1998.

KANICKY, J. R.; SHAH, D. O. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 256, n. 1, p. 201-207, 2002.

KAO, J. S. et al. Short-Term Glucocorticoid Treatment Compromises Both Permeability Barrier Homeostasis and Stratum Corneum Integrity: Inhibition of Epidermal Lipid Synthesis Accounts for Functional Abnormalities. **J. Investig. Dermatol.**, v. 120, n. 3, p. 456-464, 2003.

KABOORANI, A.; BLANCHET, P. Determining the linear viscoelastic region of sugar maple wood by dynamic mechanical analysis. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 4392-4409, 2014.

KASIM, N. A. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Mol. Pharm.**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KERKHOF, P. C. M.; BAUER, F. W.; MAASSEN-DE GROOD, R. M. Methotrexate inhibits the leukotriene B₄ induced intraepidermal accumulation of polymorphonuclear leukocytes. **Br. J. Dermatol.**, v. 113, n. 3, p. 251-255, 1985.

KIM, D-H. et al. Fabrication of pseudo-ceramide-based lipid microparticles for recovery of skin barrier function. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 94, p. 236-241, 2012.

KIMBALL, A. B. et al. National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 58, n. 6, p. 1031-1042, 2008.

KIVITI, S. et al. Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: A cohort of 28 patients. **Autoim. Ver.**, v. 13, n. 11, p. 1109-1113, 2014.

KONG, L.; BHOSALE, R.; ZIEGLER, G. R. Encapsulation and stabilization of β -carotene by amylose inclusion complexes. **Food Res. Int.**, v. 105, p. 446-452, 2018.

KOYNOVA, R. D. et al. Structure and phase behavior of hydrated mixtures of L-dipalmitoylphosphatidylcholine and palmitic acid. Correlations between structural rearrangements, specific volume changes and endothermic events. **Chem. Phys. Lipids**, v. 48, n. 3-4, p. 205-215, 1988.

KRUEGER, G.; ELLIS, C. N. Psoriasis—recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53, n. 1, p. S94-S100, 2005.

KRUEGER, G. et al. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. **Arch. Dermatol.**, v. 137, n. 3, p. 280-284, 2001.

KRUEGER, J. G. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 46, n. 1, p. 1-26, 2002.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 64, n. suppl 2, p. ii30-ii36, 2005.

KUCHAREKOVA, M.; KERKHOF, P. C. M.; VAN DER VALK, P. G. M. A randomized comparison of an emollient containing skin-related lipids with a petrolatum-based emollient as adjunct in the treatment of chronic hand dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 48, n. 6, p. 293-299, 2003.

KUCHAREKOVA, M. et al. Effect of a lipid-rich emollient containing ceramide 3 in experimentally induced skin barrier dysfunction. **Contact dermatitis**, v. 46, n. 6, p. 331-338, 2002.

KÜCHLER, S. et al. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. **Int. J. Pharm.**, v. 377, n. 1-2, p. 169-172, 2009.

LAGERWALL, J. P. F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio-and microtechnology. **Curr. Appl. Phys.**, v. 12, n. 6, p. 1387-1412, 2012.

LAKSHMI, P. K. et al. Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: Phase I and phase II studies. **Indian J. Dermatol. Venereal. Leprol.**, v. 73, n. 3, p. 157-161, 2007.

LAKSHMI, P. K.; BHASKRAN, S. Phase II study of topical niosomal urea gel-an adjuvant in the treatment of psoriasis. **Int. J. Pharm. Sci. Ver. Res.**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2011.

LANCEROTTO, L. et al. Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. **Surg. Radiol. Anat.**, v. 33, n. 10, p. 835-842, 2011.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **Int. J. Pharm.**, v. 447, n. 1-2, p. 12-21, 2013.

LANGLEY, R. G. B.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, C. E. M. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 64, n. suppl 2, p. ii18-ii23, 2005.

LANGLEY, R. G.; ELLIS, C. N. Evaluating psoriasis with psoriasis area and severity index, psoriasis global assessment, and lattice system physician's global assessment. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 51, n. 4, p. 563-569, 2004.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 64, p. 175-193, 2000.

LEBWOHL, M. et al. Topical therapy in psoriasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, n. 10, p. 673-684, 1995.

LEBWOHL, M.; HERRMANN, L. G. Impaired skin barrier function in dermatologic disease and repair with moisturization. **Cutis**, v. 76, n. 6 Suppl, p. 7-12, 2005.

LEE, E. S. et al. Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system. **Colloids Surf. B Bionterfaces**, v. 82, n. 1, p. 190-195, 2011.

LEE, J. B. et al. Efficient dermal delivery of retinyl palmitate: progressive polarimetry and Raman spectroscopy to evaluate the structure and efficacy. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 78, p. 111-120, 2015.

- LEE, K. W. Y. et al. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 365, n. 1, p. 190-199, 2009.
- LEE, W. R. et al. Topical Delivery of Methotrexate Via Skin Pretreated With Physical Enhancement Techniques: Low-Fluence Erbium:YAG Laser and Electroporation. **Lasers Surg. Med.**, v. 40, n. 7, p. 468-476, 2008.
- LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: structure/toxicity relationships. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 469, p. 166-179, 2015.
- LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. Partition coefficients and their uses. **Chem. Ver.** v. 71, n. 6, p. 525-616, 1971.
- LI, Z.; ZHAO, X.; WANG, Z. Study on the formation and rheological properties of sucrose stearate lamellar liquid crystals. **J. Disper. Sci. Technol.**, v. 38, n. 1, p. 152-158, 2017.
- LIN, Y-K. et al. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. **Int. J. Nanomedicine**, v. 5, p. 117, 2010.
- LINTNER, K. et al. The effect of a synthetic ceramide-2 on transepidermal water loss after stripping or sodium lauryl sulfate treatment: an in vivo study. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 19, n. 1, p. 15-25, 1997.
- LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Semisolid SLN™ dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, n. 2, p. 155-160, 2002.
- LIU, Y.; FRIBERG, S. E. Role of liquid crystal in the emulsification of a gel emulsion with high internal phase fraction. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 340, n. 2, p. 261-268, 2009.
- LODÉN, M. Effect of moisturizers on epidermal barrier function. **Clini. Dermatol.**, v. 30, n. 3, p. 286-296, 2012.
- LODÉN, M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 4, n. 11, p. 771-788, 2003.
- LODÉN, M.; BARANY, E. Skin-identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape-stripped and detergent-perturbed human skin. **Acta Derm. Venereol.**, v. 80, n. 6, p. 412-415, 2000.
- LODÉN, M.; LINDBERG, M. The influence of a single application of different moisturizers on the skin capacitance. **Acta Derm. Venereol.**, v. 71, n. 1, p. 79-82, 1991.
- LOEWI, G. The acid mucopolysaccharides of human skin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 52, n. 3, p. 435-440, 1961.

LOPES, L. B. et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 63, n. 2, p. 146-155, 2006.

LUCHE, S.; SANTONI, V.; RABILLOUD, T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, n. 3, p. 249-253, 2003.

MACLAUGHLIN, J.; HOLLICK, M. F. Aging Decreases the Capacity of Human Skin to Produce Vitamin D₃. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 4, p. 1535-1538, 1985.

MADISON, K. C. et al. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. **J. Investig. Dermatol.**, v. 88, n. 6, p. 714-718, 1987.

MAJUMDAR, S.; AGGARWAL, B. B. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of Ikb α phosphorylation and degradation. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2911-2920, 2001.

MAKAI, M. et al. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, n. 1-2, p. 95-107, 2003.

MAN, M-Q.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. **Arch. Dermatol.**, v. 129, n. 6, p. 728-738, 1993.

MAO-QIANG, M. et al. A natural lipid mixture improves barrier function and hydration in human and murine skin. **J. Soci. Cosm. Chem.**, v. 47, n. 3, p. 157-166, 1996a.

MAO-QIANG, M. et al. Optimization of physiological lipids mixtures for barrier repair. **J. Investig. Dermatol.**, v. 106, n. 5, p. 1096-1101, 1996b.

MAO-QIANG, M.; BROWN, B. E.; WU-PONG, S. Exogenous nonphysiologic vs physiologic lipids: divergent mechanisms for correction of permeability barrier dysfunction. **Arch. Dermatol.**, v. 131, n. 7, p. 809-816, 1995.

MAO-QIANG, M.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 2, p. 791-798, 1993.

MASON, J.; MASON, A. R.; CORK, M. J. Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review. **Br. J. Dermatol.**, v. 142, n. 3, p. 351-364, 2000.

MATHIAS, C. G. T.; WILSON, D. M.; MAIBACH, H. I. Transepidermal Water Loss as a Functional of Skin Surface Temperature. **J. Investig. Dermatol.**, v. 77, n. 2, p. 219-220, 1981.

MCCULLOUGH, J. L. et al. Factors affecting human percutaneous penetration of methotrexate and its analogues in vitro. **J. Investig. Dermatol.**, v. 66, n. 2, p. 103-107, 1976.

MCGRAFTH, K.; KLÉMAN, M. Spiral textures in lyotropic liquid crystals: first order transition between normal hexagonal and lamellar gel phases. **J. Phys. II**, v. 3, n. 6, p. 903-926, 1993.

MEEPHANSAN, J. et al. Effect of methotrexate on serum levels of IL-22 in patients with psoriasis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 21, n. 4, p. 501-504, 2011.

MEGURO, S. et al. Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). **Arch. Dermatol. Res.**, v. 292, n. 9, p. 463-468, 2000.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 54, p. S3-S17, 2002.

MENTER, A. et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 58, n. 5, p. 826-850, 2008.

MENTER, A. et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 60, n. 4, p. 643-659, 2009a.

MENTER, A. et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 61, n. 3, p. 451-485, 2009b.

MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Micelles, vesicles and microemulsions. **J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2**, v. 77, n. 4, p. 601-629, 1981.

MITRA, R. K.; PAUL, B. K. Effect of NaCl and temperature on the water solubilization behavior of AOT/nonionics mixed reverse micellar systems stabilized in IPM oil. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 255, n. 1-3, p. 165-180, 2005.

MONTAUDIÉ, H. et al. Methotrexate in psoriasis: a systematic review of treatment modalities, incidence, risk factors and monitoring of liver toxicity. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 25, n. s2, p. 12-18, 2011.

MOORE, D. J.; REREK, M. E.; MENDELSON, R. Role of ceramides 2 and 5 in the structure of the stratum corneum lipid barrier. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 21, n. 5, p. 353-368, 1999.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MOTTA, S. et al. Abnormality of water barrier function in psoriasis: role of ceramide fractions. **Arch. Dermatol.**, v. 130, n. 4, p. 452-456, 1994a.

MOTTA, S. et al. Interlamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum. **Acta Derm. Venereol. Supplementum**, v. 186, p. 131-132, 1994b.

MOTTA, S. et al. Ceramide composition of the psoriatic scale. **Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.**, v. 1182, n. 2, p. 147-151, 1993.

MROWIETZ, U. et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 303, n. 1, p. 1-10, 2011.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

NAGLE, A. et al. Efficacy study of vesicular gel containing methotrexate and menthol combination on parakeratotic rat skin model. **J. Liposome Res.**, v. 21, n. 2, p. 134-140, 2011.

NAKAJIMA, K. et al. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. **J. Investig. Dermatol.**, v. 133, n. 11, p. 2555-2565, 2013.

NÉMETH, ZS. et al. Rheological behaviour of a lamellar liquid crystalline surfactant-water system. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 145, n. 1-3, p. 107-119, 1998.

NESSEEM, D. I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 26, n. 3, p. 387-399, 2001.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n.1, p. 496-509, 2009.

NEWBURGER, A. E.; WEINSTEIN, G. D.; MCCULLOUGH, J. L. Biological and biochemical actions of methotrexate in psoriasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 70, n. 4, p. 183-186, 1978.

NIEMANN, C.; WATT, F. M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. **Trends Cell Biol.**, v. 12, n. 4, p. 185-192, 2002.

NOGRALES, K. E. et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. **Br. J. Dermatol.**, v. 159, n. 5, p. 1092-1102, 2008.

NURSE, D. S. Effect of antimetabolites on epidermal structures. **Arch. Dermatol.**, v. 87, n. 2, p. 258-265, 1963.

OGINO, K.; OTA, M. Studies of spontaneous emulsification. II. The effect of nonionic surfactants. **Bull. Chem. Soc. Jpn**, v. 49, n. 5, p. 1187-1190, 1976.

OHTA, N.; HATTA, I. Interaction among molecules in mixtures of ceramide/stearic acid, ceramide/cholesterol and ceramide/stearic acid/cholesterol. **Chem. Phys. Lipids**, v. 115, n.1, p. 93-105, 2002.

O'NEIL, M. J. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 15 ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2013.

OSBORNE, D. W. Diethylene glycol monoethyl ether: an emerging solvent in topical dermatology products. **J. Cosm. Dermatol.**, v. 10, n. 4, p. 324-329, 2011.

OLSEN, E. A. The pharmacology of methotrexate. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 25, n. 2, p. 306-318, 1991.

OSTLUND JUNIOR, R. E. Phytosterols in human nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 533-549, 2002.

OYAFUSO, M. H. et al. Development and In Vitro Evaluation of Lyotropic Liquid Crystals for the Controlled Released of Dexamethasone. **Polymers**, v. 9, n. 8, p. 330, 2017.

PALLA, B. J.; SHAH, D. O. Stabilization of high ionic strength slurries using surfactant mixtures: molecular factors that determine optimal stability. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 256, n. 1, p. 143-152, 2002.

PANONNUMMAL, R.; SABITHA, M. Anti-psoriatic and toxicity of methotrexate loaded chitin nanogel in imiquimod induced mice model. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 110, p. 245-258, 2018.

PARENTE, M. E. et al. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **Int. J. Cosm. Sci.**, v. 37, n. 5, p. 511-518, 2015.

PARISI, R. et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **J. Investig. Dermatol.**, v. 133, n. 2, p. 377-385, 2013.

PARNAMI, N. et al. Development and characterization of nanocarriers for topical treatment of psoriasis by using combination therapy. **Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.**, v. 42, n. 6, p. 406-412, 2014.

PASQUALI, R. C.; BREGNI, C. Balance Hidrofílico-Lipofílico (*HLB*) del Colesterol y sus Aplicaciones en Emulsiones del Tipo Aceite en Agua. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 25, n. 2, p. 239-244, 2006.

PATHIRANA, D. et al. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris: Supported by the EDF/EADV/IPC. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 23, p. 1-70, 2009.

PÈNZES, T.; CSÓKA, I.; ERŐS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. **Rheol. Acta**, v. 43, n. 5, p. 457-463, 2004.

PILGRAM, G. S. K. et al. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 117, n. 3, p. 710-717, 2001.

PINTO, M. F. et al. A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 447, n. 1-2, p. 519-526, 2014.

POE, M. Acid Dissociation Constants of Folic Acid, Dihydrofolic acid, and Methotrexate. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 11, p. 3724-3728, 1977.

POE, M. Proton Magnetic Resonance Studies of Folate, Dihydrofolate, and Methotrexate. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 20, p. 7025-7032, 1973.

POUMAY, Y.; COQUETE, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. **Arch. Dermatol. Research**, v. 298, n. 8, p. 361-369, 2007.

PRAÇA, F. S. G. et al. Liquid crystal nanodispersions enable the cutaneous delivery of photosensitizer for topical PDT: fluorescence microscopy study of skin penetration. **Curr. Nanosci.**, v. 8, n. 4, p. 535-540, 2012.

PRASAD, R. et al. Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study. **Int. J. Pharm.**, v. 333, n. 1, p. 70-78, 2007.

PRASAD, R. et al. Studies on in vitro and in vivo transdermal flux enhancement of methotrexate by a combinational approach in comparison to oral delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 35, n. 11, p. 1281-1292, 2009.

PROKSCH, E. The role of emollients in the management of diseases with chronic dry skin. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v. 21, n. 2, p. 75-80, 2008.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

PUIG, L. PASI 90 response: the new standard in therapeutic efficacy for psoriasis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 29, n. 4, p. 645-648, 2015.

RAVI, B. C. K.; KAUR, I.; KUMAR, B. Topical methotrexate therapy in palmoplantar psoriasis. **Indian J. Dermatol. Venereal. Leprol.**, v. 65, n. 6, p. 270-272, 1999.

REES, R. B.; BENNETT, J. H. Methotrexate vs. Aminopterin for Psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 83, n. 6, p. 970-972, 1961.

REN, Q. et al. In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation of the Effect of Saturated Fat Acid Chain Length on the Transdermal Behavior of Ibuprofen-Loaded Microemulsions. **J. Pharm. Sci.**, v. 103, n. 6, p. 1680-1691, 2014.

REPKA, M. A.; MCGINITY, J. W. Physical mechanical, moisture absorption and bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose hot-melt extruded. **Biomaterials**, v. 21, n. 2, p. 1509-1517, 2000.

RIM, J. H. et al. Electrical measurement of moisturizing effect on skin hydration and barrier function in psoriasis patients. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 30, n. 4, p. 409-413, 2005.

ROACH, C. et al. Comparison of *Cis* and *Trans* Fatty Acid Containing Phosphatidylcholines on Membranes Properties. **Biochemistry**, v. 43, n.20, p. 6344-6351, 2004.

ROBERSON, E. D. O.; BOWCOCK, A. M. Psoriasis genetics: breaking the barrier. **Trends Genet.**, v. 26, n. 9, p. 415-423, 2010.

ROBSON, K. J. et al. 6-Hydroxy-4-sphingene in human epidermal ceramides. **J. Lipid Res.**, v. 35, n. 11, p. 2060-2068, 1994.

ROENIGK JUNIOR, H. H.; MAIBACH, H. I.; WEINSTEIN, G. D. Use of Methotrexate in Psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 105, n. 3, p. 363-365, 1972.

ROENIGK, H. H. et al. Methotrexate in psoriasis: Consensus conference. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 38, n. 3, p. 478-485, 1998.

ROMITI, R. et al. Prevalence of psoriasis in Brazil—a geographical survey. **Int. J. Dermatol.**, v. 56, n. 8, p. e167-e168, 2017.

ROSSETI, F. C. et al. Optimization of protoporphyrin IX skin delivery for topical photodynamic therapy: nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 99-108, 2016.

ROUGIER, A. Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age and sex in man. **J. Soc. Cosm. Chem.**, v. 39, p. 15-26, 1988.

ROZNER, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Competitive solubilization of cholesterol and phytosterols in nonionic microemulsions studied by pulse gradient spin-echo NMR. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 321, n. 2, p. 418-425, 2008.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **J. Chromatogr. B**, v. 764, n. 1, p. 217-254, 2001.

SABAT, R. et al. Immunopathogenesis of psoriasis. **Exp. Dermatol.**, v. 16, n. 10, p. 779-798, 2007.

SADHALE, Y.; SHAH, J. C. Glyceryl monooleate cubic phase gel as chemical stability enhancer of cefazolin and cefuroxime. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 3, n. 4, p. 549-556, 1998.

SADHALE, Y.; SHAH, J. C. Stabilization of insulin against agitation-induced aggregation by the GMO cubic phase gel. **Int. J. Pharm.**, v. 191, n. 1, p. 51-64, 1999.

SAGALOWICZ, L. et al. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 17, n.5, p. 204-214, 2006.

SAHLE, F. F.; WOLHRAB, J.; NEUBERT, R. H. H. Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 86, n. 2, p. 244-250, 2014.

SALAMA, A. H.; SHAMMA, R. N. Tri/tetra-block-co-polymeric nanocarriers as potential ocular delivery system for lornoxicam: in-vitro characterization, and in-vivo estimation of corneal permeation. **Int. J. Pharm.**, v. 492, n. 1-2, p. 28-32, 2015.

SALMAZI, R. et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **Int. J. Nanomedicine**, v. 10, p. 4815, 2015.

SANTOS, A. M. et al. Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. **Int. J. Pharm.**, v. 524, n. 1-2, p. 330-338, 2017.

SARBATIAN, A. et al. Subcutaneous adipose tissue classification. **Europ. J. Histochem.**, v. 54, n. 4, p. 226-230, 2010.

SATO, J. et al. Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. **J. Investig. Dermatol.**, v. 111, n. 2, p. 189-193, 1998.

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

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulfate from their matrices. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 48, p. 263-270, 2011.

SCHEUPLEIN, R. J.; BLANK, I. H. Permeability of the skin. **Physiol. Ver.**, v. 51, n. 4, p. 702-747, 1971.

SCHMITT, J.; WOZEL, G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. **Dermatology**, v. 210, n. 3, p. 194-199, 2005.

SCHWARTZ, N. O. Adaptation of the sensory texture profile method to skin care products. **J. Texture Stud.**, v. 6, n. 1, p. 33-42, 1975.

SCOTT, E. J.; REINERTSON, R. P. Morphologic and physiologic effects of chemotherapeutic agents in psoriasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 33, n. 6, p. 357-369, 1959.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 5, p. 1150-1158, 2006.

SEITE, S. et al. Emollient for maintenance therapy after topical corticotherapy in mild psoriasis. **Exp. Dermatol.**, v. 18, n. 12, p. 1076-1078, 2009.

SENYİĞİT, T. et al. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: in vitro and in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 403, n. 1-2, p. 123-129, 2011.

SERUP, J.; BLICHMANN, C. Epidermal hydration of psoriasis plaques and the relation to scaling. Measurement of electrical conductance and transepidermal water loss. **Acta Derm. Venereol.**, v. 67, n. 4, p. 357-359, 1987.

SEVERINO, P. et al. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125-130, 2011.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.

SHAH, M. H.; PARADKAR, A. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 67, n. 1, p. 166-174, 2007.

SHARAR, M. et al. Fungicidal and nematicidal activities for essential oils formulated in Janus emulsion. **Green Chem. Lett. Ver.**, v. 10, n. 3, p. 121-128, 2017.

SHIBASAKI, M.; WILSON, T. E.; CRANDALL, C. G. Neural control and mechanisms of eccrine sweating during heat stress and exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 110, n. 5, p. 1692-1701, 2006.

SIGMUNSDOTTIR, H. et al. Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the numbers of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. **Exp. Dermatol.**, v. 13, n. 7, p. 426-434, 2004.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Phys. Rep.**, v. 324, n. 2, p. 107-269, 2000.

SINGKA, G. S.L. et al. Enhanced topical delivery and anti-inflammatory activity of methotrexate from na activated nanogel. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 76, n. 2, p. 275-281, 2010.

SLOAN, K. B.; WASDO, S. C.; RAUTIO, J. Design for optimized topical delivery: prodrugs and a paradigm change. **Pharm. Res.**, v. 23, n. 12, p. 2729-2747, 2006.

SMALL, D. M. Lateral packing in lipids and membranes. **J. Lipid Res.**, v. 25, n.13, p. 1490-1500, 1984.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SMART, J. D. et al. The retention of C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: an in vitro study. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 20, n. 6, p. 83-90, 2003.

SOLER, L. I. et al. Transdermal delivery of alprazolam from a monolithic patch: formulation based on in vitro characterization. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 38, n. 10, p. 1171-1178, 2012.

SOT, J. et al. Different Effects of Long-and Short Chain Ceramides on the Gel-Fluid and Lamellar-Hexagonal Transitions of Phospholipids: A calorimetric, NMR, and X-Ray Diffraction Study. **Biophys. J.**, v. 88, n. 5, p. 3368-3380, 2005.

SRISUK, P. et al. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. **Int. J. Pharm.**, v. 427, n. 2, p. 426-434, 2012.

STEWART, W. D.; WALLACE, S. M.; RUNIKS, J. O. Absorption and local action of methotrexate in human and mouse skin. **Arch. Dermatol.**, v. 106, n. 3, p. 357- 360, 1972.

STICHERLING, M. Mechanisms of psoriasis. **Drug Discov. Today Dis. Mech.**, v. 2, n. 2, p. 275-281, 2005.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery – a promising option for orally less efficient drugs. **J. Control. Release**, v. 114, n. 1, p. 15-40, 2006.

SUTTON, L. et al. A clinical study of determine the efficacy and safety of 1% methotrexate/Azone® (MAZ) gel applied topically once daily in patients with psoriasis vulgaris. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, n. 7, p. 464-467, 2001.

SYED, T. A. et al. Management of Psoriasis Vulgaris with Methotrexate 0,25% In a Hydrophilic Gel: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 5, n. 4, p. 299-302, 2001.

TAGAMI, H.; YOSHIKUNI, K. Interrelationship between water-barrier and reservoir functions of pathologic stratum corneum. **Arch. Dermatol.**, v. 121, n. 5, p. 642-645, 1985.

TAKAHASHI, H. et al. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. **J. Dermatol.**, v. 41, n. 2, p. 144-148, 2014.

TAKEUCHI, I. et al. Estradiol-loaded PLGA nanoparticles for improving low bone mineral density of cancellous bone caused by osteoporosis: application of enhanced charged nanoparticles with iontophoresis. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 155, p. 35-40, 2017.

TAMILSELVI, E. et al. Association of Disease Severity with IL-1 levels in Methotrexate-treated Psoriasis Patients. **Scand. J. Immunol.**, v. 78, n. 6, p. 545-553, 2013.

TAN, Y. T. F.; PEH, K. K.; AL-HABALI, O. Effect of Carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. **AAPS PharmSciTech**, v. 1, n. 3, p. 69-78, 2000.

TEMPLER, R. H. Thermodynamic and theoretical aspects of cubic mesophases in nature and biological amphiphiles. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 3, n. 3, p. 255-263, 1998.

TERANISHI, Y. et al. Increased spontaneous production of IL-8 in peripheral blood monocytes from the psoriatic patient: relation to focal infection and response to treatments. **J. Dermatol. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 8-15, 1995.

TERNOWITZ, T.; HERLIN, T. Neutrophil and monocyte chemotaxis in methotrexate-treated psoriasis patients. **Acta Derm. Venereol.**, v. 120, p. 23-26, 1985.

TIAN, H.; CRONSTEIN, B. N. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.**, v. 65, n. 3, p. 168-173, 2007.

TIDDY, G. J. T. Surfactant-water liquid crystal phases. **Phys. Rep.**, v. 57, n. 1, p. 1-46, 1980.

TORRES-ÁLVAREZ, B. et al. The effect of methotrexate on the expression of cell adhesion molecules and activation molecule CD69 in psoriasis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 21, n. 3, p. 334-339, 2007.

TROTTA, M. et al. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **Int. J. Pharm.**, v. 270, n. 1, p. 119-125, 2004.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; GASCO, M. R. Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. **Pharm. Acta Helv.**, v. 71, n. 2, p. 135-140, 1996.

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. Nova York: VCH Publishers, 1989.

THORNFELDT, C. Critical and Optimal Molar Ratios of Key Lipids. In: LODÉN, M.; MAIBACH, I. **Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function**. Danvers: CRC Press, 1999. cap. 27, p. 337-348.

VAIDYANATHAN, R.; CHAUBAL, M. G.; VASAVADA, R. C. Effect of pH and solubility on in vitro skin penetration of methotrexate from a 50% v/v propylene glycol-water vehicle. **Int. J. Pharm.**, v. 25, n. 1, p. 85-93, 1985.

VANAJA, K.; SHOBHA RANI, R. H.; SACCHIDANANDA, S. Formulation and clinical evaluation of ultradeformable liposomes in the topical treatment of psoriasis. **Clin. Res. Reg. Aff.**, v. 25, n. 1, p. 41-52, 2008.

VÁVROVÁ, K. et al. L-Serine and Glycine Based Ceramide Analogues as Transdermal Permeation Enhancers: Polar Head Size and Hydrogen Bonding. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, n. 14, p. 2351-2353, 2003.

VERHEIJ, M. et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 75, 1996.

VICENTINI, F. T. M. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 83, n. 1, p. 16-24, 2013.

VYAS, S.P.; JAITLEY, V.; KANAUIA, P. Self-assessing supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems. **Pharmazie**, v. 52, n. 4, p. 259-267, 1997.

WAGNER, E. F. et al. Psoriasis: what we have learned from mouse models. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 6, n. 12, p. 704-714, 2010.

WAKITA, H. et al. Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 286, n. 6, p. 350-354, 1994.

WALL, P. D. Cord cells responding to touch, damage and temperature of skin. **J. Neurophysiol.**, v. 23, n. 2, p. 197-210, 1960.

WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. The Structure and Function of Skin. In: WALTERS, K. A. **Dermatological and Transdermal Formulations**. Londres: Informa Healthcare, 2002, p.15-53.

WARREN, R. B. et al. An intensified dosing schedule of subcutaneous methotrexate in patients with moderate to severe plaque-type psoriasis (METOP): a 52 week, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, n. 10068, p. 528-537, 2017.

WATT, F. M. Involucrin and others markers of keratinocyte terminal differentiation. **J. Investig. Dermatol.**, v. 81, n. 1, p. S100-S103, 1983.

WEINSTEIN, G. D.; GOLDFADEN, G.; FROST, P. Methotrexate: mechanism of action on DNA synthesis in psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 104, n. 3, p. 236-243, 1971.

WEINSTEIN, G. D.; MCCULLOUGH, J. L.; OLSEN, E. Topical Methotrexate Therapy for Psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 125, n. 2, p. 227-230, 1989.

WEINSTEIN, G. D.; GOLDFADEN, G.; FROST, P. Methotrexate of Action on DNA Synthesis in Psoriasis. **Arch. Dermatol.**, v. 104, n. 3, p. 236-143, 1971.

WEINSTEIN, G. D.; VELASCO, J. Selective action of methotrexate on psoriatic epidermal cells. **J. Investig. Dermatol.**, v. 59, n. 1, p. 121-127, 1972.

- WHITE, S. H.; MIREJOVSKY, D.; KING, G. I. Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. **Biochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3725-3732, 1988.
- WIDEMANN, B. C.; ADAMSON, P. C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. **Oncologist**, v. 11, n. 6, p. 694-703, 2006.
- WIECHERS, J. W. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. **Pharm. Weekbl.**, v. 11, n. 6, p. 185-198, 1989.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 64, p. 128-137, 2012.
- WILSON, J. D.; WALKER, J. D. The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. **J. Clin. Invest.**, v. 48, n. 2, p. 371-379, 1969.
- WITMAN, P. M. Topical therapies for localized psoriasis. **Mayo Clin. Proc.**, v. 76, n. 9, p. 943-949, 2001.
- WOJAS-PELCO, A. et al. Cytokine network in psoriasis. Cross-talk between keratinocytes and cells. **Cent. Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 3, p. 3-4, 2007.
- WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet.**, v. 40, n. 2, p. 77-84, 2001.
- WOOLFSON, A. D. et al. Design of an apparatus incorporating a linear variable differential transformer for the measurement of type III bioadhesion to cervical tissue. **Int. J. Pharm.**, v. 84, n. 1, p. 69-76, 1992.
- WONG, T. W.; ZHAO, A. S.; HUI, S. W. Pilot study of topical delivery methotrexate by electroporation. **Br. J. Dermatol.**, v. 152, n. 3, p. 524-530, 2005.
- WHO. **Global reports on PSORIASIS**. Geneva, 2016. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204417/9789241565189_eng.pdf.psoriasis?sequence=1. Acesso em: 21 nov. 2018.
- WU, J. et al. Effect of EO and PO positions in nonionic surfactants on surfactant properties and demulsification performance. **Colloids Surf. A**, v. 252, n. 1, p. 79-85, 2005.
- YAGHMUR, A. et al. Effects of Pressure and Temperature on the Self-Assembled Fully Hydrated Nanostructures of Monoolein – Oil Systems. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 1177-1185, 2009.
- YANG, F.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Transdermal delivery of the anti-rheumatic agent methotrexate using a solid-in-oil nanocarrier. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 82, n. 1, p. 158-163, 2012.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids Surf. B Bionterfaces**, v. 78, n. 2, p. 185-192, 2010.

YA-XIAN, Z.; SUETAKE, T.; TAGAMI, H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin: Relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 291, n. 10, p. 555-559, 1999.

YAZICI, A. C. et al. The changes in expression of ICAM-3, KI-67, and CD31 in psoriatic lesions before and after etanercept treatment. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 297, n. 6, p. 249-255, 2005.

YE, L. et al. Abnormal epidermal barrier recovery in uninvolved skin supports the notion of an epidermal pathogenesis of psoriasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 134, n. 11, p. 2843, 2014.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H-H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema—an in vivo study. **Int. J. Pharm.**, v. 307, n. 2, p. 232-238, 2006.

ZANOLLI, M. D.; SHERERTZ, E. F.; HEDBERG, A. E. Methotrexate: Anti-inflammatory or antiproliferative. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 22, n. 3, p. 523-524, 1990.

ZEB, A. et al. Improved skin permeation of methotrexate via nanosized ultradeformable liposomes. **Int. J. Nanomedicine**, v. 11, p. 3813-3824, 2016.

ZETTERSTEN, E. M. et al. Optimal ratios of topical stratum corneum lipids improve barrier recovery in chronologically aged skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 37, n. 3, p. 403-408, 1997.

ZHANG, Y. et al. Transdermal baicalin delivery using diethylene glycol monoethyl ether-mediated cubic phase gel. **Int. J. Pharm.**, v. 479, n. 1, p. 219-226, 2015.

ZONNEVELD, I. M. et al. Methotrexate Osteopathy in Long-Term, Low-Dose Methotrexate Treatment for Psoriasis and Rheumatoid Arthritis. **Arch. Dermatol.**, v. 132, n. 2, p. 184-187, 1996.