

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**DESENVOLVIMENTO DE CRISTAIS LÍQUIDOS E HIDROGÉIS PARA
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE METOTREXATO PARA TRATAMENTO DE
PSORÍASE**

ALFENAS/MG

2020

MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**DESENVOLVIMENTO DE CRISTAIS LÍQUIDOS E HIDROGÉIS PARA
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE METOTREXATO PARA TRATAMENTO DE
PSORÍASE**

Tese de Doutorado apresentada pela aluna Maria Tereza Carneiro Paschoal Bernardes como parte dos requisitos para o Programa de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho.

Co-orientador: Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes

ALFENAS/MG

2020

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

B518d Bernardes, Maria Tereza Carneiro Paschoal.
Desenvolvimento de cristais líquidos e hidrogéis para administração
cutânea de metotrexato para tratamento de psoríase. / Maria Tereza Carneiro
Paschoal. -- Alfenas/MG, 2021.
126f.: il. --

Orientadora: Flávia Chiva Carvalho.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de
Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Cristais Líquidos. 2. Metotrexato. 3. Hidrogéis. I. Carvalho, Flávia
Chiva. II. Título.

CDD-616.526

MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**DESENVOLVIMENTO DE CRISTAIS LÍQUIDOS E HIDROGÉIS PARA
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE METOTREXATO PARA TRATAMENTO DE
PSORÍASE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2021.

Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Bruno da Fonseca dos Santos
Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Aline Martins dos Santos
Instituição: Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Juliana dos Santos Neves
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado eletronicamente por **Flávia Chiva Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 22/02/2021, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana dos Santos Neves, Professor do Magistério Superior**, em 22/02/2021, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Marcello Garcia Trevisan, Professor do Magistério Superior**, em 22/02/2021, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Bruno da Fonseca dos Santos, Usuário Externo**, em 23/02/2021, às 08:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Aline Martins dos Santos, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada meu DEUS por iluminar meu caminho de vida! Sem sua força e graça, nada seria possível!

Agradeço a UNIFAL/MG, por possibilitar a execução deste trabalho científico, enfatizando o excelente trabalho da Coordenação de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, profa. Fernanda Borges de Araújo Paula, prof. Diogo Teixeira Carvalho e funcionária Fabiana de Sousa Santos.

A todos os funcionários da UNIFAL/MG que acompanharam de certa forma a execução deste trabalho, pelo apoio e por proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento das práticas ao longo desses anos, em especial à Neila e Andrea.

A todos os professores desta mesma instituição pelos ensinamentos desde o início da pesquisa, destacando aqui dois exemplos de dedicação à profissão: a profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira que sempre esteve presente e ao prof. Dr. Rômulo Dias Novaes que gentilmente aceitou ser meu co-orientador, me acompanhou e contribuiu para que este trabalho fosse concluído.

Quero agradecer em especial, minha orientadora Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho, pela paciência, amizade, confiança, incentivo e empenho dedicado à esta tese, sem ela, eu não teria chegado com êxito nesta etapa.

Aos meus pais Elma e Oswaldo, que apesar da distância, sempre se orgulharam de mim, me dando forças para concluir mais uma conquista em minha carreira acadêmica e profissional, então, ajudaram na realização deste sonho. Não se esquecendo da tia Jane que com sua psicologia, compartilhou conversas, incentivou e aumentou minha autoestima. Aos meus irmãos que, mesmo tímidos, se mostraram sempre orgulhosos de mim.

Às minhas queridas filhas, também chamadas de bonequinhas, Alyssa e Isabella que compartilharam de todo este processo e, que não só neste momento, mas em todos os momentos da minha vida se fizeram presentes, apostaram no meu potencial e me incentivaram a continuar meus estudos. Ao meu esposo Alexandre pela paciência e compreensão nas etapas deste trabalho, afinal de contas, devo admitir que este trabalho exigiu horas de dedicação exclusiva. Amo vocês!

Aos meus amigos de trabalho (que são muitos!) e parceiros de pesquisa (sem deixar de citar a Dra. Laíla e a Dra. Sandra), por toda a ajuda, apoio e contribuição durante este período tão importante da minha formação acadêmica.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Por fim, agradeço a mim mesma, por não desistir, seguir em frente, e estar pronta para iniciar um novo desafio! Fica aqui o sentimento de mais uma conquista na minha vida!

RESUMO

Introdução: A psoríase é uma doença autoimune, inflamatória e crônica de pele em que há uma aceleração do crescimento e proliferação celular, resultando em eritemas e lesões de formato mal definidos, com colorações brancas e vermelhas e descamação da epiderme. O metotrexato (MTX) é um dos fármacos para o tratamento de uso sistêmico, mas há diversos efeitos colaterais. A administração tópica pode ser uma estratégia para vetorizar a liberação deste fármaco no local de ação, mas como o estrato córneo epidérmico é uma barreira de permeação de fármacos hidrofílicos, é necessário o desenvolvimento de veículos que promovam sua penetração na pele. **Objetivo:** Avaliar o efeito tópico do MTX na psoríase empregando como veículos sistemas líquido-cristalinos (CLs) e hidrogéis. **Método:** Estudo do comportamento de fases pela construção do diagrama ternário de fases combinando polissorbatos 80 (Tween[®] 80), miristato de isopropila (MIP) e água MiliQ para obtenção de CLs. Os hidrogéis testados foram baseados em quitosana (HQS), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HHPMC) e carbômero alquilado (HCA). As amostras foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada (MLP), reologia oscilatória, análise de textura (TPA), solubilidade do MTX, obtenção do perfil de liberação, estudos *ex vivo* de bioadesão e ensaios *in vivo* em camundongos com indução da dermatite psoriática. **Resultados:** Sistemas contendo tensoativo/óleo/água nas proporções 60/10/30 e 60/20/20 foram caracterizados como fases lamelares (L1 e L2, respectivamente) e 50/10/40 e 50/20/30 como fases hexagonais (H1 e H2, respectivamente). Foi possível solubilizar o MTX na concentração de 2 mg/mL nos CLs e no hidrogel de HCA (pH=7,4), e 0,1 mg/mL no hidrogel HQS (pH=3,5) e não solubilizado em HPMCP (pH=4,5). A reologia oscilatória mostrou que fases hexagonais são mais elásticas que as lamelares, e HCA com comportamento semelhante às lamelares. O teste de TPA correlacionou com a reologia, porém a bioadesão *ex vivo* mostrou melhor interação de HCA com a pele suína em relação aos CLs. O perfil de liberação mostrou que H1 e H2 retiveram mais o MTX que L1 e L2, devido a sua estrutura mais rígida e organizada. HCA liberou mais MTX mostrando que a rede polimérica gelificada retém menos o fármaco. O perfil de liberação ajustado para o modelo matemático de Weibull indicou que a cinética de liberação é rápida e complexa. Como prova de princípio, os testes *in vivo* demonstraram que os CLs promoveram um efeito inflamatório mais exacerbado, porém o hidrogel de HCA teve eficácia semelhante à dexametasona. **Conclusão:** Apesar de ainda ser necessário estudos para entender a toxicidade e segurança dos sistemas, nos testes *in vivo* em

camundongos com dermatite psoriática induzida por imiquimode, a aplicação tópica do MTX pode ser uma nova abordagem para o tratamento da psoríase com menos efeitos colaterais e eficácia comprovada.

Palavras-chave: Cristais líquidos; Metotrexato; Hidrogéis

ABSTRACT

Introduction: Psoriasis is an autoimmune, inflammatory and chronic skin disease in which there is an acceleration of cell growth and proliferation, resulting in erythema and ill-defined lesions, with white and red stains and peeling of the epidermis. Methotrexate (MTX) is one of the drugs for the treatment of systemic use, but there are several side effects. Topical administration may be a strategy to vectorize the release of this drug at the site of action, but as the stratum corneum epidermis is a permeation barrier for hydrophilic drugs, it is necessary to develop vehicles that promote its penetration into the skin. **Objective:** To evaluate the topical effect of MTX in psoriasis using liquid-crystalline systems (CLs) and hydrogels as vehicles. **Method:** Study of phase behavior by constructing the ternary phase diagram combining polysorbate 80 (Tween® 80), isopropyl myristate (MIP) and MilliQ water to obtain CLs. The hydrogels tested were based on chitosan (HQS), hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HHPMC) and alkylated carbomer (HCA). The samples were characterized by polarized light microscopy (MLP), oscillatory rheology, texture analysis (TPA), solubility of MTX, obtaining the release profile, ex vivo bioadhesion studies and in vivo tests in mice with induction of psoriatic dermatitis. **Results:** Systems containing surfactant / oil / water in the proportions 60/10/30 and 60/20/20 were characterized as lamellar phases (L1 and L2, respectively) and 50/10/40 and 50/20/30 as hexagonal phases (H1 and H2, respectively). It was possible to solubilize MTX at a concentration of 2 mg / mL in the CLs and in the HCA hydrogel (pH = 7.4), and 0.1 mg / mL in the HQS hydrogel (pH = 3.5) and not solubilized in HPMCP (pH = 4.5). Oscillatory rheology showed that hexagonal phases are more elastic than lamellar phases, and HCA with behavior similar to lamellar phases. The TPA test correlated with rheology, but ex vivo bioadhesion showed a better interaction of HCA with swine skin in relation to CLs. The release profile showed that H1 and H2 retained MTX more than L1 and L2, due to their more rigid and organized structure. HCA released more MTX showing that the gelled polymer network retains the drug less. The release profile adjusted for the Weibull mathematical model indicated that the release kinetics is fast and complex. As a proof of principle, in vivo tests showed that CLs promoted a more exacerbated inflammatory effect, but the HCA hydrogel had similar efficacy to dexamethasone. **Conclusion:** Although studies are still needed to understand the toxicity and safety of the systems, in in vivo tests in mice with imiquimod-induced psoriatic dermatitis, topical application of MTX may be a new approach for the treatment of psoriasis with less side effects and proven efficacy.

Keywords: Liquid crystals; Methotrexate; Hydrogels

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Lesões características da psoríase em diversas partes do corpo.....	22
Figura 2	- Fisiopatologia complexa da pele com psoríase.....	25
Figura 3	- Escala Esquemática para tratamento da psoríase.....	30
Figura 4	- Modelo do eixo IL-23/Th17 na imunopatogênese da psoríase e moléculas alvo da psoríase.....	31
Figura 5	- MTX em diferentes formas iônicas dependendo do pH.....	35
Figura 6	- Estrutura da pele.....	36
Figura 7	- Penetração de substâncias aplicadas topicamente através da pele não tratada e após tratamento com injeção direta, redução de barreira e tecnologias de cavitação.....	39
Figura 8	- Estruturas químicas: A: miristato de isopropila; B: polissorbato 80.....	43
Figura 9	- Estruturas químicas: A: quitosana; B: carbono alquilado; C: hidroxipropilmetilcelulose.....	49
Figura 10	- Estrutura molecular do Imiquimode.....	50
Figura 11	- Representação esquemática das mesofases dos cristais líquidos: (A) Lamelar; (B) Hexagonal; (C) Cúbica.....	59
Figura 12	- Representação esquemática da célula de difusão utilizada para o teste de liberação <i>in vitro</i>	65
Figura 13	- Indução da dermatite psoriática em modelo animal	68
Figura 14	- Representação gráfica da curva de calibração de soluções padrão contendo MTX a 0,5- 20 µg/mL a 306 nm por espectrofotometria UV.....	75
Figura 15	- Sequencia das fórmulas na foto: da esquerda para a direita: HQS, HCA, Os hidrogéis estão na concentração de 0,1mg/mL MTX.....	77
Figura 16	- Diagrama de fases composto por Tween 80 [®] , miristato de isopropila (MIP) e água, L1 e L2 (fase lamelar) H1 e H2 (fase hexagonal).....	78
Figura 17	- Sequencia das fórmulas na foto (Aumento 20x): da esquerda para a direita: a) L1(sistema lamelar); b) L2 (sistema lamelar); c) H1 (sistema hexagonal); d) H2 (sistema hexagonal).....	79
Figura 18	- Sequencia das fórmulas na foto: da esquerda para a direita: L1, L2, H1, H2, Todas as formulações na concentração de 2mg/mL MTX.....	80

Figura 19	- Reogramas das formulações líquido cristalinas (L1, L2, H1, H2) e hidrogel HCA vazias e carregadas com MTX.....	82
Figura 20	- Representação gráfica do cromatograma da solução padrão de MTX e o meio receptor.....	87
Figura 21	- Representação gráfica da curva de calibração de soluções padrão contendo MTX a 0,5-35 µg/mL a 306 nm.....	88
Figura 22	- Gráfico de distribuição de resíduos (em torno do eixo x) <i>versus</i> concentração	89
Figura 23	- Representação gráfica da curva de calibração ajustada pela soma residual dos mínimos quadrados ponderados com soluções padrão contendo MTX a 0,5-35 µg/mL a 306 nm, evidenciando que os valores calculados a partir da equação são praticamente coincidentes com os valores experimentais.....	90
Figura 24	- Representação gráfica da % liberação de MTX <i>versus</i> tempo das formulações L1, L2, H1, H2 e HCA.....	93
Figura 25	- Camundongos suíços após o tratamento tópico de MTX: A - Grupo CN (controle negativo da dermatite), sem dermatite e sem tratamento; B - Grupo CD (controle positivo da dermatite), IMQ; C-: Grupo CT (controle positivo do tratamento), IMQ + dexametasona creme; D - Grupo L1 , IMQ + fórmula L1-MTX; E - Grupo H2 , IMQ + fórmula H2-MTX; F - Grupo HCA , IMQ + fórmula HCA-MTX.....	95
Figura 26	- Imagens macroscópicas da face dérmica dos fragmentos de pele coletados, representação do escore histopatológico (diagrama de campo hexagonal) de congestão vascular (A) e comprimento da rede macrovascular total (B) em camundongos controle e com dermatite psoriática tratados com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nas imagens, os vasos sanguíneos são observados como filamentos em cor escura (preta ou marrom). O losango representa o efeito conjunto dos escores histopatológicos de todos os grupos. Grupos com escores histopatológicos mais elevados apresentam maior influência sobre o deslocamento do losango	98
Figura 27	- Fotomicrografias da pele e parâmetros microestruturais (A-C) da epiderme de camundongos controle e com dermatite psoriática tratados com diferentes formulações de metotrexato - aumento de 40X. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ +	

fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Símbolos nas imagens: ▲ Cabeça de seta= queratina, De= derme, Ep= epiderme, Estrela= microabscesso. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05). NI= não identificado..... 100

Figura 28 - Fotomicrografias da pele e parâmetros microestruturais da derme (A e B) de camundongos controle e com dermatite psoriáticapsoariática tratados com diferentes formulações de metotrexato – aumento de 40X. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Símbolos nas imagens: * Asterisco= Matriz colagênica, ▲ Cabeça de seta= vasos sanguíneos, →Seta= células do conjuntivo da derme. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05)..... 102

Figura 29 - Atividade de ciclooxygenase 2 (COX-2), mieloperoxidase (MPO), N-acetilglucosaminidase (NAG), e níveis de prostaglandina E2 (PGE2) na pele de camundongos controle e com dermatite psoriática tratadas com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05)..... 104

Figura 30 - Níveis de citocinas na pele de camundongos controle e com dermatite psoriática tratadas com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05)..... 105

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	- Índice de Gravidade e Extensão das Lesões Psoriáticas Utilizadas para Cálculo do PASI.....	52
Quadro 2	- Cálculo do Psoriasis Areaand Severity Index (PASI).....	52
Tabela 1	- Princípios ativos utilizados na terapêutica da psoríase.....	27
Tabela 2	- Terapêutica tópica da Psoríase – coadjuvantes.....	27
Tabela 3	- Corticosteróides tópicos usados na Psoríase.....	28
Tabela 4	- Absorbâncias de soluções-padrão de MTX a 0,5 – 20 µg/mL em metanol a 306 nm.....	74
Tabela 5	- Precisão e exatidão do método analítico para quantificação do MTX nas formulações.....	75
Tabela 6	- Concentração real de MTX em diferentes pHs para avaliação da solubilidade.....	76
Tabela 7	- Porcentagem de Tween [®] 80/MIP/água e classificação das formulações L1, L2, H1 e H2.....	80
Tabela 8	- Valores do módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e viscosidade (n) na frequência de 5Hz.....	83
Tabela 9	- Resultado das análises de TPA das formulações CLs e Hidrogel não carregados.....	84
Tabela 10	- Resultado das análises de bioadesão das formulações CLs e hidrogel.....	85
Tabela 11	- Leitura das áreas sob a curva das soluções-padrão contendo MTX a 0,5 – 35 µg/mL a 306 nm.....	88
Tabela 12	- Resultados para a determinação de exatidão e precisão intra e interdia do método de quantificação de MTX por CLAE.....	91
Tabela 13	- Critérios para avaliação e escolha dos modelos matemáticos.....	94
Tabela 14	- Índice de PASI antes e depois do tratamento da dermatite psoriática.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Porcentagem
μL	- Microlitro
A/O	- Água/Óleo
CD	- Controle positivo da dermatite
CEUA/UNIFAL	- Comissão de ética do uso de Animais/Universidade de Alfenas
CL	- Cristal líquido
CN	- Controle negativo da dermatite
COX-2	- Ciclooxigenase
cP	- Centipoise
CT	- Controle positivo do tratamento
E	- Extensão
EDTA	- Ácido etileodiaminotetracético
ELISA	- Enzima-linked Immunosorbent Assay
EUA	- Estados Unidos da América
FASE S	- Fase de síntese
g	- Grama
G'	- Módulo elástico
G''	- Módulo viscoso
H&E	- Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HCA	- Hidrogel de carbono alquilado
HHPMC	- Hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose
HQS	- Hidrogel de quitosana
Hz	- Hertz
IG	- Índice de gravidade
IL	- Interleucina
IL-1	- Interleucina 1
IL-10	- Interleucina 10
IMQ	- Imiquimode
INF- γ	- Interferon gama

KDa	- Kilodalton
LCD	- Liquor carbonis detergens
M	- Molar
MEs	- Microemulsões
mg	- Miligrama
mg/mL	- Miligrama por mililitro
min.	- Minuto
MIP	- Miristato de isopropila
MLP	- Microscopia de luz polarizada
mm	- Milímetro
MPO	- Mieloperoxidase
MTX	- Metotrexato
NAG	- N-acetil- β -D-glucosaminidase
NLCs	- Nano carreadores lipídicos
nm	- Nanômetro
mM	- Milimolar
nmol	- Nanomol
°C	- Grau centígrado
O/A	- Óleo/Água
OPD	- Ortofenilenodiamino
p/p	- peso por peso
PASI	- Psoriasis Área and Severity Index
PBS	- Tampão fosfato de sódio
PBST20	- Tampão fosfato de sódio acrescido de tween 20
PGE-2	- Prostaglandina E2
pH	- potencial hidrogeniônico
PSC	- Porcentagem da superfície corporal
rpm	- Rotação por minuto
R-pNP	- Derivado sintético do p-aminofenol
RVL	- Região Viscoelástica Linear
SAS/MS	- Secretaria de Atenção à Saúde/Ministério da Saúde
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TNF- α	- Fator de necrose tumoral

TPA	- Texture Profile Analysis
UEM	- Universidade Estadual de Maringá
UV	- Ultravioleta
η'	- Viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	PSORÍASE.....	22
2.1.1	Diferentes tipos de Psoríase.....	22
2.1.2	Fatores Responsáveis pela Psoríase.....	24
2.1.3	Tratamento Tópico Da Psoríase.....	26
2.2	INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO METOTREXATO NA PSORÍASE	32
2.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO METOTREXATO (MTX).....	34
2.4	ESTRUTURA DA PELE	35
2.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICOS E TRANSDÉRMICOS.....	38
2.6	FORMULAÇÕES COM BASE EM TENSOATIVOS	40
2.7	HIDROGÉIS.....	44
2.8	MODELO DE INDUÇÃO DE PSORÍASE.....	49
2.9	ÍNDICE DA GRAVIDADE DA PSORÍASE POR ÁREA (PASI).....	51
3	OBJETIVO.....	54
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4	MATERIAIS.....	55
4.1	LISTA DE EQUIPAMENTOS.....	55
4.2	LISTA DE MATERIAIS.....	56
5	METODOLOGIA.....	57
5.1	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO MTX POR ESPECTROSCOPIA UV.....	57
5.2	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX EM DIFERENTES pHs	57
5.3	OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	57
5.4	CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASE TERNÁRIO DOS SISTEMAS CONTENDO TENSOATIVO, ÓLEO E ÁGUA.....	58
5.4.1	Incorporação do MTX nos Sistemas Líquido Cristalinos.....	59
5.5	MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP).....	59

5.6	CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA POR ENSAIOS DE FLUXO CONTÍNUO E ENSAIOS OSCILATÓRIOS DE VARREDURA DE FREQUÊNCIA.....	60
5.7	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA (TPA).....	61
5.8	TESTE DE AVALIAÇÃO DA FORÇA BIOADESIVA.....	61
5.9	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METOTREXATO NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO MTX	62
5.9.1	Curva de Calibração.....	63
5.9.1.1	Precisão.....	63
5.9.1.2	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	64
5.10	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	65
5.11	ENSAIO <i>IN VIVO</i>	66
5.11.1	Animais e ética.....	67
5.11.2	Modelo de psoríase e grupos experimentais.....	67
5.11.3	Análise Macroscópica da Face Dérmica da Pele	68
5.11.4	Análise bioquímica de ciclooxigenase e prostaglandina	69
5.11.5	Análise bioquímica de N-acetilglucosaminidase e mieloperoxidase	69
5.11.6	Análise de citocinas.....	70
5.11.7	Processamento histológico da pele	71
5.11.8	Análise histopatológica da pele.....	71
5.11.9	Análise histomorfométrica da pele	72
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
6	RESULTADOS	74
6.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX.....	74
6.1.1	Precisão e exatidão.....	75
6.2	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX EM DIFERENTES pHs.....	76
6.3	PREPARAÇÃO E INCORPORAÇÃO DO MTX NOS HIDROGÉIS	77
6.4	DIAGRAMA TERNÁRIO DE FASES	78
6.5	MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP).....	79
6.6	INCORPORAÇÃO DO MTX NOS SISTEMAS CRISTAIS LÍQUIDOS (CLs)	80

6.7	ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA DOS CLs E HIDROGÉIS.....	80
6.8	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) DOS CLs E HIDROGEL.....	84
6.9	ANÁLISE DO PERFIL DE BIOADESÃO DOS CLs E HIDROGÉL.....	85
6.10	VALIDAÇÃO DO MTX POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	86
6.10.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	90
6.11	TESTE DE LIBERAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CLs e HIDROGÉIS.....	92
6.12	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	95
7	DISCUSSÃO.....	107
8	CONCLUSÃO.....	113
	REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença autoimune, provocando inflamação crônica da pele que afeta aproximadamente 2-3% da população nos EUA e mais de 125 milhões de pessoas em todo o mundo. A doença é caracterizada por descamação da pele, e se manifesta com a formação de lesões em placas pequenas e localizadas podendo cobrir o corpo inteiro, atingindo a pele, mucosa oral e genital, bem como as articulações e, que exibem células inflamatórias e neovascularização resultantes da hiperproliferação da epiderme com diferenciação incompleta de queratinócitos. A causa da psoríase é desconhecida, embora pareça ser uma doença autoimune com a probabilidade de predisposição genética (SRISUK *et al.*, 2012; AVASATTHI *et al.*, 2015).

Pacientes com psoríase experimentam níveis aumentados de estresse, ansiedade, depressão e raiva. Tratamentos de primeira linha foram desenvolvidos para o tratamento da psoríase, mas são frequentemente menos eficazes devido à baixa penetração, além de ser inconveniente para uso prolongado ou associado, com toxicidade significativa (SRISUK *et al.*, 2012; PRINZ, 2017).

A epiderme da pele é constituída principalmente por estrato córneo rico em queratinócitos mortos chamados de corneócitos, melanócitos e células de Langerhans. Há também uma rede de proteínas (por exemplo, queratina, filagrina e loricrina) e revestidas com uma camada de gordura (por exemplo, ceramidas, ácidos graxos, colesterol) que a mantém coesa. Para doenças como psoríase, o desafio é vencer esta barreira da epiderme para permeação de fármacos sem atingir a corrente sanguínea para promover ação tópica (PALMER; DELOUISE, 2016).

O metotrexato (MTX), um antimetabólito, análogo do ácido fólico, aprovado pela FDA dos EUA no início de 1972 para o tratamento da psoríase leve e moderada com administração oral e parenteral, provoca ulceração mucosa, estomatite, supressão da medula óssea, fibrose hepática e cirrose em uso crônico. Estudos que exploram a administração tópica do MTX apontam sua baixa penetração cutânea, porém pode ser uma saída vantajosa aos pacientes para evitar seus efeitos adversos sistêmicos apesar de exibirem baixa penetração através do estrato córneo, devido à sua hidrofília e alta dissociação em condições fisiológicas. A hidrossolubilidade dependente do pH, a dissociação em condições fisiológicas de pH e alto peso molecular são restrições para o desenvolvimento de formulações tópicas contendo MTX,

e ainda, a presença de lipídeos no estrato córneo representa barreira lipofílica que restringe a permeação de moléculas hidrofílicas (AVASATTHI *et al.*, 2015; AMARJI *et al.*, 2015).

O tratamento tópico com administração de medicamento diretamente sobre a lesão cutânea permite minimizar possíveis efeitos colaterais do tratamento em outros órgãos e na pele não lesada. Nas formas leves de psoríase, a terapêutica tópica, seja em monoterapia, seja combinada, costuma ser suficiente para o controle das lesões. Nas formas moderadas a graves, o tratamento local, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, propicia mais conforto ao paciente e acelera a melhora (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2009).

Estratégias para aumentar a solubilidade e particionamento de fármacos na pele incluem além das convencionais emulsões, determinadas combinações de fase oleosa, tensoativo e água, podendo formar nanoestruturas autoemulsionantes termodinamicamente estáveis, como microemulsões e cristais líquidos, que agregam vantagens como estabilidade, grande área interfacial entre regiões com diferentes polaridades favorecendo tanto a incorporação de ativos hidrofílicos e hidrofóbicos, como também controlar a liberação dos fármacos. Estudos mostram que formulações de fase lamelar proporcionam melhores taxas de penetração e de retenção de água, hidratação e oclusão cutânea quando comparadas com formulações regulares como emulsões, e tem grande potencial para o tratamento de doenças como psoríase (CHORILLI *et al.*, 2011; LAGERWALL; SCALIA, 2012; HOSMER; STEINER; LOPES, 2013; LY *et al.*, 2016).

Além das vantagens relacionadas à maior hidratação que estes sistemas podem causar, os cristais líquidos possuem estabilidade termodinâmica, permitindo que os sistemas se formem espontaneamente, facilitando o escalonamento. Por serem sistemas anfifílicos os cristais líquidos permitem a incorporação de fármacos hidrofílicos como o MTX, e podem ajudar em sua permeação já que é um fármaco classificado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como de baixa permeabilidade. A estrutura nanométrica aumenta a área interfacial e capacidade de solubilização, sendo bastante estáveis com boas características bioadesivas, facilita a incorporação de ativos e penetração na pele, Dependendo do tipo de fase, formam sistemas com diferentes texturas e viscosidade, melhorando a aplicabilidade e oclusão sobre a pele (YAMADA *et al.*, 2011; IWAI; FUKASAWA; SUZUKI, 1998; KIM *et al.*, 2012; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL), 2011).

Outra forma farmacêutica amplamente utilizada para formulações tópicas é o hidrogel. Os polímeros formadores de hidrogéis apresentam características hidrofílicas, possuem

biocompatibilidade e baixa tensão interfacial com os fluidos biológicos e tecidos. Essas características fazem com que os hidrogéis sejam aplicados na área biomédica, na regeneração de tecidos, em implantes e, na área farmacêutica, são utilizados para liberação controlada de fármacos e proteínas em locais específicos do organismo (ABREU, 2008). O comportamento reológico viscoelástico dos hidrogéis é adequado para administração tópica. Limón *et al.* (2019) mostraram através de seus estudos em testes *ex vivo* de permeação cutânea a ação dos hidrogéis de 1,3-bis[(3-octadecil-1-imidazolio) metil] benzeno dibromido (gelificante). Estes promovem com sucesso a permeação e retenção de fármacos como triamcinolona acetinado, betametasona 17-valerato, metotrexato, gemcitabine e tacrolimus na pele. Nos experimentos *in vivo* demonstraram que estes hidrogéis diminuem a hiperplasia e reduzem o dano tecidual macroscópico tipicamente observado na pele psoriásica, mais do que estes fármacos dissolvidos em solução. Estas características, além da fácil preparação, tornam os hidrogéis uma boa alternativa a outras para o tratamento da psoríase, aumentando a concentração do medicamento na pele e minimizando os efeitos colaterais.

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma formulação tópica contendo MTX para efeito local no tratamento da psoríase. Para isso, foram empregadas duas estratégias, desenvolvimento de sistemas baseados em tensoativos do tipo cristais líquidos, e desenvolvimento de hidrogéis. As etapas deste trabalho consistem em determinar o comportamento de fases de sistemas estabilizados por tensoativo, identificar cristais líquidos, explorar diferentes polímeros na obtenção de hidrogéis, para atuarem como veículos semissólidos para administração tópica do MTX; caracterizar os veículos quanto à reologia, análise de textura e perfil de liberação *in vitro*, analisar a bioadesão *ex vivo*, e ainda, avaliar o efeito *in vivo* dos sistemas em modelo animal de psoríase induzido por imiquimode para demonstrar a vantagem e eficácia da utilização do MTX pela via tópica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PSORÍASE

A psoríase é uma doença crônica, inflamatória de pele, proliferativa na qual existem tanto fatores genéticos quanto fatores ambientais. As lesões características consistem em lesões vermelhas, escamosas, nitidamente demarcadas, com placas endurecidas, presente particularmente sobre as superfícies extensas em placas (FIGURA 1). A psoríase tem uma prevalência estimada em todo o mundo de 0,1-3% e, até 50% dos pacientes podem apresentar uma diminuição espontânea em diferentes períodos de tempo (SABIQA *et al.*, 2014). Acredita-se que as células dendríticas, queratinócitos e as células T desempenham um papel importante na patogênese da psoríase. De fato, estas células são as principais responsáveis para a produção de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, principalmente interleucina (IL)-6, IL-23, IL-17, IL-21 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estes estímulos inflamatórios conduzem aos queratinócitos uma hiperproliferação e a formação de placas de psoríase (BESSAR *et al.*, 2016).

Figura 1 - Lesões características da psoríase em diversas partes do corpo.



Fonte: KALIANDRA CAINELLI (2019); PSORÍASE (2019); PSORÍASE – ENTENDA SEUS VÁRIOS ASPECTOS (2019).

2.1.1 Diferentes tipos de Psoríase

Tipos de psoríase foram relatados: psoríase em placas (também conhecida como psoríase vulgar); psoríase eruptiva; psoríase inversa, também chamada psoríase intertriginosa ou flexural; psoríase pustulosa, que pode tomar a forma de pustulose palmoplantar ou pustular generalizado; psoríase do couro cabeludo, psoríase artropática ou psoríase eritrodérmica e artrite psoriática (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Os tipos de psoríase podem ser classificados abaixo:

- Psoríase vulgar ou psoríase em placa: afeta aproximadamente 90% das pessoas com psoríase. Está definido por clássicas placas vermelhas com uma escala prateada, que é composta de células mortas da pele. As placas podem variar em tamanho de alguns milímetros para aquelas que cobrem grandes áreas do corpo. São frequentemente simétricas e comuns em superfícies extensoras, como os cotovelos e joelhos. Essas placas coçam e, algumas vezes, doem, podendo atingir todas as partes do corpo, inclusive genitais. Em casos graves, a pele em torno das articulações pode rachar e sangrar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).
- Psoríase gutata: apresenta-se como pequenas gotas cor de rosa salmão na pele. Geralmente a placa tem cor na escala prata-branca. A psoríase gutata afeta cerca de 10% de pessoas com psoríase é frequentemente desencadeada por uma estreptococo. As feridas são cobertas por uma fina escama, diferente das placas típicas da psoríase que são grossas (GOMAN, 2017).
- Psoríase inversa ou flexural: são lesões que aparecem muito vermelhas nas dobras cutâneas, mais comumente sob os seios, axilas, perto os genitais, sob as nádegas ou em dobras abdominais. Aparece como manchas vermelhas e brilhantes de pele, mas com menos escala do que muitas vezes está presente em outros tipos de psoríase. Pode ser dolorosa devido à natureza dos locais que se desenvolve e quadro pode agravar em pessoas obesas ou quando há sudorese excessiva e atrito na região (GOMAN, 2017).
- Psoríase pustulosa: nesta forma, podem ocorrer manchas, bolhas ou pústulas (pequena bolha que parece conter pus) em todas as partes do corpo ou em áreas menores, como mãos,

pés ou dedos (chamada de psoríase palmoplantar). Geralmente, se desenvolve rápido, com bolhas de pus que aparecem poucas horas depois de a pele tornar-se vermelha. As bolhas secam dentro de um dia ou dois, mas podem reaparecer durante dias ou semanas. A forma generalizada pode causar febre, calafrios, coceira intensa e fadiga (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).

- Psoríase eritrodérmica: embora seja rara, é uma emergência médica. É extremamente inflamatória e pode afetar a maior parte da superfície do corpo fazendo com que a pele se torne brilhante vermelha e inflamada, com erupção cutânea, sensação de coceira e queimação. Não há pústulas, mas há uma perda de líquido e calor (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).
- Psoríase do couro cabeludo: pode se assemelhar à dermatite seborréica. O crescimento capilar normalmente não é afetado, mas onde ocorrer, há perda de cabelo, geralmente crescem de volta quando a psoríase for resolvida. Psoríase do couro cabeludo pode ser muito difícil de controlar, particularmente quando a escala se torna mais espessa (GOMAN, 2017).
- Psoríase artropática ou artrite psoriática: é um tipo de artrite acompanhada de inflamação da pele (psoríase). Pode afetar até 10% das pessoas com psoríase. É um distúrbio auto-imune, onde as defesas do corpo atacam o articulações causando inflamação e dor. Afeta mais comumente as articulações dos dedos dos pés e mãos, coluna e juntas dos quadris e pode causar rigidez progressiva e até deformidades permanentes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).

2.1.2 Fatores Responsáveis pela Psoríase

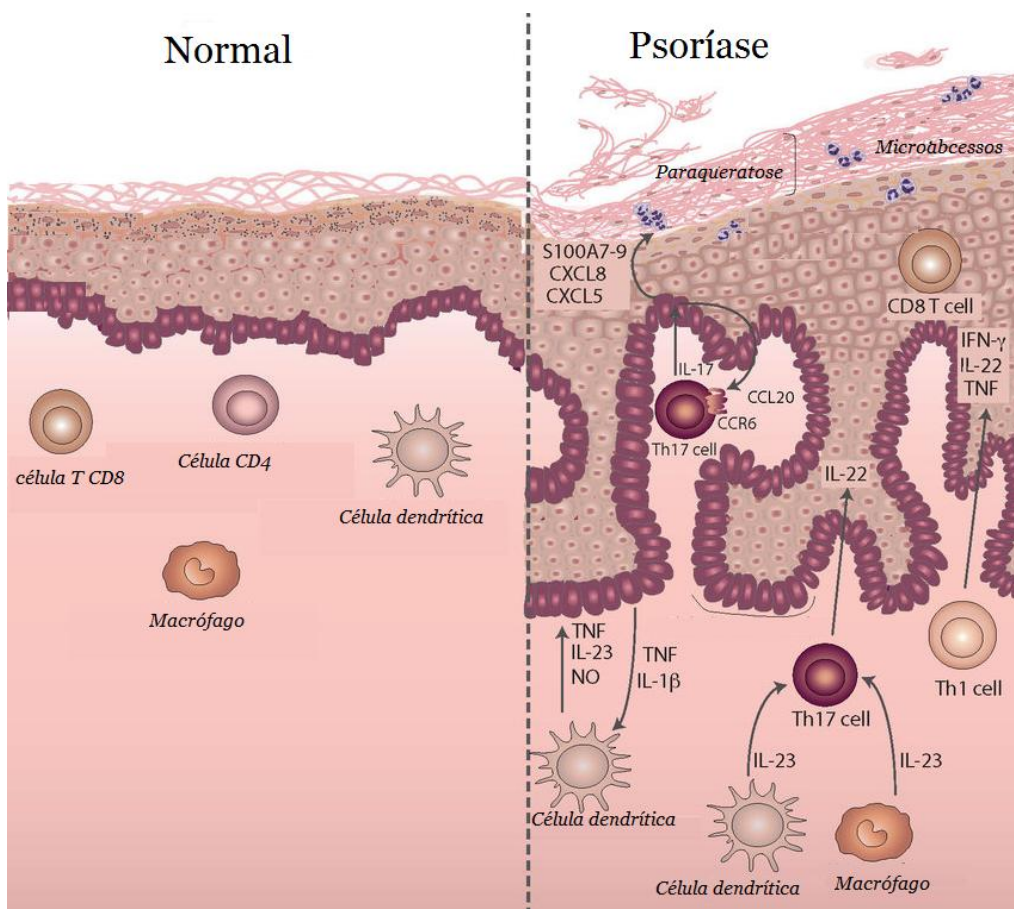
A psoríase é uma doença multifatorial e responsável por uma anomalia da proliferação e diferenciação queratinócitos. Diversos fatores estão envolvidos na patogênese e os principais são: fatores genéticos; fatores ambientais com agentes infecciosos como estreptococos; fatores fisiológicos como o estresse e fatores imunológicos, por ser uma doença inflamatória crônica ou doença auto-imune induzida pela interação entre queratinócitos. Essas interações, provavelmente desencadeadas por um ou mais antígenos

ainda desconhecidos, são responsáveis pela ativação de linfócitos T específicos desencadeando e mantendo a inflamação em curso da psoríase (MIRTIC *et al.*, 2017).

Este desequilíbrio envolve o sistema imunológico inato e adaptativo, onde os linfócitos T atuam sobre as células saudáveis da pele, atacando-as como se tivesse tratando de uma infecção, provavelmente como consequência de uma predisposição genética. E ainda, fatores endógenos e exógenos que podem provocar a psoríase, cortes na pele ou exposição exagerada ao sol, infecções precedentes, stress, consumo exagerado de álcool ou drogas, medicações prescritas para outros problemas (como lítio ou medicamentos antimaláricos) ou até sob influência do ambiente que envolve o organismo, podendo também contribuir para uma piora posterior da doença (DOENÇAS AUTO-IMUNES, 2008).

Pesquisas direcionadas na imunopatogênese da psoríase resultaram em várias terapias altamente específicas de componentes alvo do sistema imunológico. Para entender como essas terapias agem contra a psoríase, é necessário a informação sobre a fisiopatologia complexa da doença (FIGURA 2) (PRINZ, 2017).

Figura 2 – Fisiopatologia complexa da pele com psoríase



Fonte: Adaptado de SUKHOV; ADAMOPOULOS; MAVERAKIS (2016).

A hipótese imunológica postula que a interação entre linfócitos T e células epidérmicas (queratinócitos e Células de Langerhans) leva à ativação de linfócitos e produção de mediadores que induzem proliferação de queratinócitos. É uma doença inflamatória associada à produção de muitas citocinas onde há anomalias e diferenciação de queratinócitos responsáveis pela paraqueratose causando alterações epidérmicas e a liberação de citocinas pelas células do sistema imune. As células ativadas produzem um conjunto de citocinas, incluindo interleucina-1 (IL-1), que ativa a apresentação antigênica, a interleucina 8 (IL-8) que recruta neutrófilos polinucleares e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que estimula proliferação de queratinócitos (PRINZ, 2017).

2.1.3 Tratamento Tópico Da Psoríase

O tratamento tópico com administração de medicamento diretamente sobre a lesão cutânea permite minimizar possíveis efeitos colaterais do tratamento em outros órgãos e na pele não lesada. Nas formas leves de psoríase, a terapêutica tópica, seja em monoterapia, seja combinada, costuma ser suficiente para o controle das lesões. Nas formas moderadas a graves, o tratamento local, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, propicia mais conforto ao paciente e acelera a melhora. As formas tópicas são mais comumente usadas no tratamento da pele psoriática, e estes geralmente contém antiinflamatórios, ativos queratolíticos e emolientes. No entanto, sua baixa biodisponibilidade dérmica e as dificuldades na sua aplicação podem resultar em efeitos terapêuticos insuficientes. Atualmente, o interesse no desenvolvimento de novos veículos para permeação tópica, estão em constante crescimento (MIRTIC *et al.*, 2017). Na Tabela 1, estão relacionados os tipos de medicamentos tópicos disponíveis no Brasil, e na Tabela 2, outros ativos utilizados como coadjuvantes tópicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2020). Como medida geral, creme hidratante (com ureia a 5%-20% e lactato de amônia a 10%, por exemplo) deve ser utilizado nas lesões 1 vez/dia.

Tabela 1 - Princípios ativos utilizados na terapêutica da psoríase

Princípios ativos	Formas de apresentação
Corticosteróides	Pomada, creme, gel, loção cremosa, loção capilar, fita oclusiva, injeção intralesional, xampu
Análogos da vitamina D (calcipotriol, calcitriol)	Pomada
coaltar e LCD (Liquor Carbonis Detergens)	Xampu, loção capilar, formulações magistrais
Antralina	Formulações magistrais
Imunomoduladores tópicos (tacrolimus, pimecrolimus)	Pomada e creme

Fonte: Sociedade Brasileira de Dermatologia (2020).

Tabela 2 - Terapêutica tópica da psoríase - coadjuvantes

Queratolíticos/hidratantes	- ácido salicílico 3 a 6 % em vaselina, cold cream, loção capilar - ureia 5 a 20% em creme, pomada e loção - lactato de amônia 12% em loção e creme - ceramidas em creme ou loção
Outros	- águas termais - óleo mineral

Fonte: Sociedade Brasileira de Dermatologia (2020).

Os corticosteroides tópicos exercem na pele ação antiproliferativa, imunossupressora, antipruriginosa, anti-inflamatória e vasoconstritora e são as medicações tópicas mais usadas no tratamento da psoríase. Os Corticosteróides tópicos como o clobetasol creme e solução capilar a 0,05% e a betametasona são os de primeira escolha entre eles. O tratamento poderá ser oclusivo nas lesões cutâneas com filme de polietileno caso sejam elas hiperkeratóticas ou xeróticas, para aumentar a penetração do fármaco. Apesar dos efeitos colaterais e adversos locais, o uso destes medicamentos ainda são frequentes. É necessário observar pois aplicação em grandes superfícies pode levar a absorção sistêmica e hipercortisolismo. É importante avaliar alternância com outras medicações tópicas. O uso em grandes superfícies pode levar a absorção sistêmica, com resultante hipercortisolismo, especialmente em crianças.

Tabela 3 – Corticosteróides tópicos usados na Psoríase

Substâncias	Principais fármacos	Uso	Apresentação	Eficácia	Cuidados
Corticosteróides potência muito alta	propionato de clobetasol 0,05%	1xdia	Pomada creme loção xampu	Alta/ Moderada	Efeitos colaterais com o uso prolongado Taquifilaxia
Corticosteróides potência alta	dipropionato de betameasona 0,05%	1xdia	Pomada Creme Loção	Moderada/ Leve	Efeitos colaterais com o uso prolongado Taquifilaxia
Corticosteróides potência média	furoato de mometasona 0,1%	1xdia	Pomada Creme	Moderada/ Leve	Efeitos colaterais com o uso prolongado Taquifilaxia
Corticosteróides potência baixa	acetato de hidrocortisona 1%	2xdia	Pomada Creme Loção	Leve/ Mínima	Efeitos colaterais com o uso muito prolongado
Corticosteróides intralesionais	acetato de triamcinolona	Lesões localizadas persistentes 3 a 5 mg/mL	Frascos de 2 mL (40mg)	Alta/ Moderada	Atrofia Efeitos sistêmicos

Fonte: Sociedade Brasileira de Dermatologia (2009).

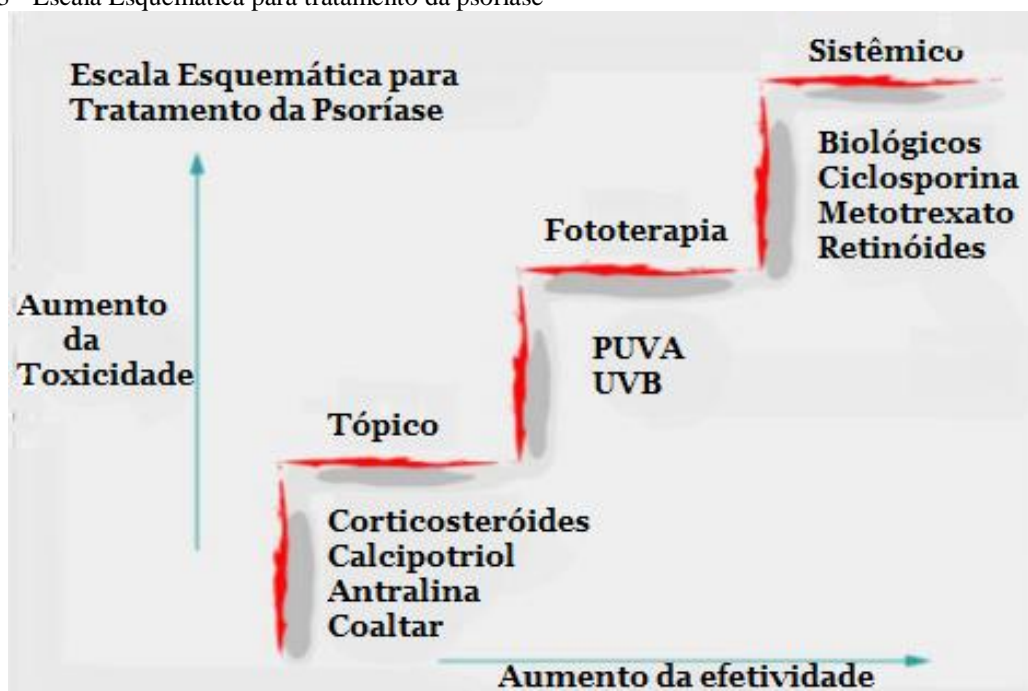
As indicações dos corticosteroides tópicos estão descritas a seguir:

- **Calcipotriol em pomada:** Deve ser utilizado 2 vezes/dia no início do tratamento, podendo ser reduzido para 1 vez/dia na fase de manutenção, A dose semanal não deve exceder 100 g. Pode provocar irritação local transitória, dermatite facial e dermatite perioral. Sempre associado à proteção solar, deve ser utilizado com cautela na face por risco de dermatite de contato irritativa e fotossensibilidade.
- **Ácido salicílico a 5% em pomada:** Deve ser aplicada nas lesões hiperkeratóticas 1 vez/dia. Pode desencadear irritação local quando utilizado em superfícies extensas. Especialmente em crianças, pode ocorrer salicilismo.
- **Alcatrão mineral a 1% em pomada:** Deve ser utilizado diariamente nas lesões de psoríase. Provoca irritação local.
- **UVB:** Os esquemas de doses e cronograma de aplicação das sessões 2-3/semana combinados ou não com fármacos (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS, 2019).

Apesar de uma ampla variedade de modalidades de tratamento que existe para o tratamento da psoríase, a insatisfação clínica representa desafios. Esquemas terapêuticos para

atender às necessidades individuais do paciente podem ser fundamentais para melhorar a adesão ao tratamento e os resultados clínicos. A maioria dos pacientes com psoríase moderada é tratada principalmente com medicações tópicas que geralmente são tratamentos práticos, seguros e eficazes, mas nem sempre com adesão correta e satisfação dos pacientes (GREENBERG, 2016). Para pacientes com psoríase leve ou moderada, o tratamento deve começar com a hidratação da pele associada a corticosteróides tópicos (dexametasona em áreas mais delgadas e clobetasol em outras áreas). Se o tratamento funcionar bem, deve-se começar a reduzir o uso de corticosteróides e usar emolientes / hidratantes, pomada de alcatrão ou ácido salicílico para manutenção. Se não houver melhora, o calcipotriol pode ser combinado. Se ainda não houver melhora clínica, a fototerapia ou terapia sistêmica deve ser considerada na mesma ordem do tratamento para psoríase grave. Para pacientes com psoríase grave, os tratamentos tópicos devem ser usados na mesma ordem que o regime de tratamento de psoríase leve ou moderado relacionado a outras terapias. Inicialmente, se houver fototerapia disponível, a radiação UVB ou PUVA deve ser utilizada. Se a resposta for suficiente, continuar o tratamento e reavaliar a cada três meses. Se não houver melhora, é recomendado iniciar o tratamento sistêmico: MTX é o medicamento de primeira linha e acitretina é o medicamento de segunda linha e, se não houver melhora, a ciclosporina é a terceira opção (FIGURA 3). A ciclosporina não deve ser combinada com fototerapia. A rotação do tratamento também deve ser considerada para minimizar as reações adversas e as doses cumulativas. Como a psoríase é uma doença com recorrência e remissão, é necessário alternar o tratamento para reduzir as reações adversas. Utilizar o tratamento em um tempo pré-determinado ou até que a dose máxima recomendada seja atingida ou até que ocorra uma reação adversa (PSORÍASE – AVALIANDO O TRATAMENTO, 2019).

Figura 3 - Escala Esquemática para tratamento da psoríase



Fonte: Adaptado de PINTO; FILIPE, (2011).

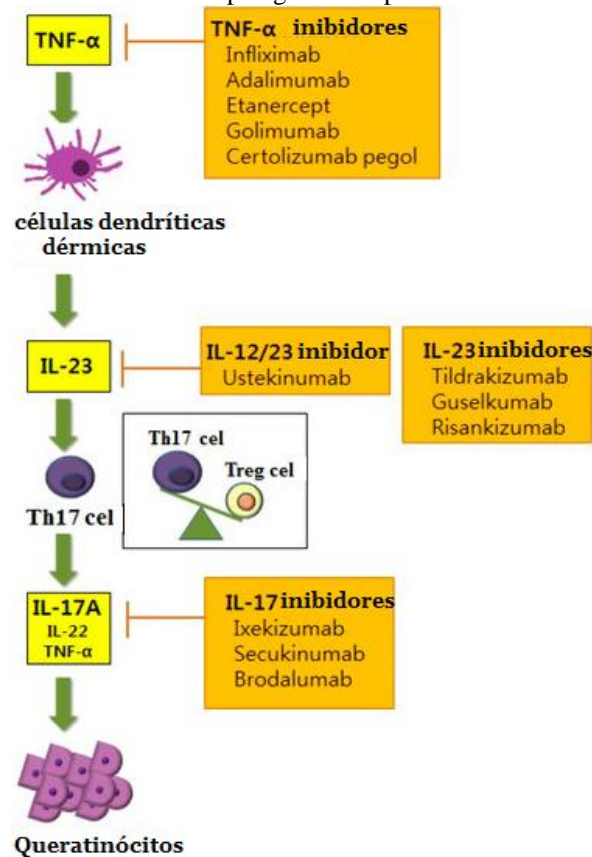
O principal objetivo do tratamento é a desaceleração da hiperproliferação de queratinócitos e diminuição da inflamação bloqueando vias inflamatórias específicas (BESSAR *et al.*, 2016). A terapia é associada a um conjunto distinto de riscos e desafios e é aplicada em pacientes conforme a gravidade da psoríase de acordo a resposta ou insatisfação com os tratamentos (GREENBERG, 2016).

Os avanços no conhecimento da fisiopatologia da psoríase permitiram o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, direcionadas especificamente para neutralizar os mediadores/células que estão na sua gênese – as chamadas terapêuticas biológicas: agentes terapêuticos produzidos por organismos, através do uso de biotecnologia recombinante. Esta abordagem revolucionou a terapêutica da psoríase, pois estes novos fármacos mostraram ser eficazes na redução do Índice PASI, com excelente perfil de segurança e com toxicidade de órgão muito menor que os tratamentos sistêmicos clássicos. Existem os tipos de agentes biológicos: anticorpos monoclonais (...mabs); anticorpos quiméricos (...ximab); anticorpos humanizados (...zumab); anticorpos humanos (...umab); proteínas de fusão (...cept). É necessário fazer a mudança de terapêutica entre biológicos com mecanismos de ação diferentes, na ausência de resposta a um deles ou quando há efeitos adversos importantes (PINTO; FILIPE, 2011).

Os anticorpos monoclonais são produtos biológicos aprovados para o tratamento da doença. O principais inibidores do TNF α são etanercept, adalimumab, e infliximab para o

tratamento de psoríase e artrite psoriática, e o golimumab tem sido aprovado para artrite psoriática. Ustekinumab, um droga que bloqueia a interleucina 12 e 23, também é aprovado para ambas as indicações. O ustekinumab interfere no desenvolvimento de linfócitos Th17, que são importantes células efetoras na inflamação psoriásica. Secukinumab foi aprovado como o primeiro bloqueio biológico IL-17A, uma citocina efetiva produzida por TH17 e outras células (FIGURA 4) (BOEHNCKE; SCHON, 2015).

Figura 4 - Modelo do eixo IL-23/Th17 na imunopatogênese da psoríase e moléculas alvo da psoríase.



Fonte: Adaptado de RONHOLT; IVERSEN, (2017).

A eficácia da terapia biológica de curto prazo parece ser melhor que as drogas sistêmicas convencionais, embora isso tenha sido comprovado em apenas em alguns estudos clínicos comparativos. Os produtos biológicos normalmente são utilizados para tratamento a longo prazo pois não há evidência de toxicidade cumulativa ou interações medicamentosas. Além disso, tem um bom perfil de segurança com apenas um pequeno aumento nas infecções oportunistas. Inibidores do TNF α são geralmente utilizados após fototerapia e quando as terapias sistêmicas convencionais falharam, ou não foram tolerados ou foram contraindicados. Este tratamento é de segunda escolha devido ao alto custos dos medicamentos, que são da

ordem de dez vezes maior do que para drogas sistêmicas convencionais (BOEHNCKE; SCHON, 2015).

2.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO METOTREXATO NA PSORÍASE

O MTX é amplamente estudado como um agente efetivo no tratamento de vários tipos de neoplasias e doenças autoimunes (ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013). O MTX é um antimetabólito, estruturalmente análogo ao ácido fólico, que inibe de maneira competitiva a atividade da enzima diidrofolato-redutase, sendo considerado quimioterápico específico da fase S (de síntese) do ciclo celular. Sua ação é mais marcante sobre populações celulares em fase de crescimento exponencial, o que explica efeito seletivo sobre células tumorais e ação sobre tecidos em proliferação. Foi originalmente usado em psoríase devido a seu efeito nos queratinócitos em rápida divisão. Sabe-se hoje, entretanto, que o efeito mais marcante do MTX pode ser anti-inflamatório, diminuindo a quimiotaxia dos polimorfonucleares, inibindo a inflamação cutânea C5- a induzida, diminuindo a quimiotaxia B4-induzida e o número de células OK-T6 positivas na epiderme. A eficácia do MTX na psoríase deve-se também a suas propriedades imunomoduladoras, freando a produção de IL-1 e diminuindo a densidade de células de Langherhans na epiderme, parecendo ainda ter efeito nas células apresentadoras de antígeno (MARTINS; ARRUDA, 2004). Contudo, o efeito do MTX *in vitro* na célula linfóide é 1000 vezes maior que o efeito do MTX sobre o queratinócito. Nas concentrações atingidas *in vivo*, o MTX atua de forma mais significativa como agente imunossupressor, por inibição da síntese de DNA em células imunocompetentes, do que como agente antiproliferativo (MARQUES, 2009).

O tratamento sistêmico com MTX é utilizado na psoríase severa, incluindo fármacos como os retinóides e ciclosporina (RAUT; PRABHU; PATRAVALE, 2013). Os benefícios e riscos da terapêutica com o MTX devem ser cuidadosamente considerados antes do início do tratamento. Em princípio, o MTX é indicado para psoríase eritrodérmica, psoríase artropática moderada a grave, psoríase pustulosa aguda (generalizada ou localizada), psoríase em placas grave ou incapacitante, e naqueles casos com má resposta à fototerapia e/ou tratamento com retinóides (MARQUES, 2009).

A escolha de MTX oral no tratamento da psoríase moderada a grave requer uma avaliação prévia da adequação do fármaco, a maioria dos pacientes respondem ao tratamento

apresentam melhora antes de 8 semanas. Os métodos não invasivos são preferidos para monitorizar hepatotoxicidade (CARRASCOSA *et al.*, 2015). O MTX pode ser administrado como monoterapia ou como terapia de combinação para a psoríase. A resposta da monoterapia é geralmente visto em 1-4 semanas, com pelo menos redução de 50% em 70-80% dos doentes tratados. O MTX também é combinado com vários outros agentes tópicos e sistêmicos para diminuir a dose e, conseqüentemente, os seus efeitos secundários, e também para aumentar a eficácia do tratamento (DOGRA; MAHAJAN, 2013).

Os pacientes que são submetidos ao uso sistêmico deste fármaco por longos períodos e em altas doses apresentam muitos efeitos adversos graves, como toxicidade gástrica, hepática, pulmonar e supressão da medula óssea (YANG; KAMIYA; GOTO, 2012). A descontinuação do MTX geralmente é dada pelo seu perfil toxicológico e não por sua ineficácia. Além disso, seus parâmetros farmacocinéticos possuem variabilidade interindividual muito elevada (30–90%). Sua biodisponibilidade em baixas doses pode ser completa, mas em altas doses diminui para cerca de 10–20%. Sua absorção intestinal é saturável e grande parte do MTX absorvido é eliminada pelo fígado num curto período de tempo, resultando em baixas doses nos tecidos alvo (MOHAMMADI-SAMANI *et al.*, 2013; PRASAD; KOUL, 2013; PRASAD, ANAND; KOUL, 2011). Desta maneira, se tornam necessários estudos que visam ao controle da liberação do MTX, para diminuir sua toxicidade e aumentar sua eficácia. No tratamento com MTX, as considerações de segurança são frequentemente limitantes em adição à eficácia. Considerações fármaco-econômicas são cada vez mais importantes na orientação das decisões de tratamento. A decisão final da escolha terapêutica do paciente com psoríase deve ser baseada em suas necessidades e preferências, mas também nas conseqüências clínicas e econômicas da estratégia terapêutica adotada, e alguns estudos confirmam maior tempo de remissão e menor custo em esquemas rotativos com o emprego do MTX (MARTINS; ARRUDA, 2004).

O MTX é disponível em comprimidos de 2,5 mg e em solução injetável de 2ml (50mg de MTX) e de 20 ml (500mg de MTX), ambos na concentração de 2,5mg/0,1ml e a seleção de pacientes ao uso do MTX deve levar em consideração os critérios de contraindicação absoluta e relativa, pensadas no contexto risco-benefício do paciente, sempre com monitorização clínica e laboratorial do paciente. (MARQUES, 2009).

Portanto, o MTX é usado no tratamento sistêmico da psoríase, por via oral ou injetável. Este fármaco causa inúmeros efeitos colaterais, logo, a administração tópica de MTX pode ser benéfica para reduzir seus efeitos colaterais.

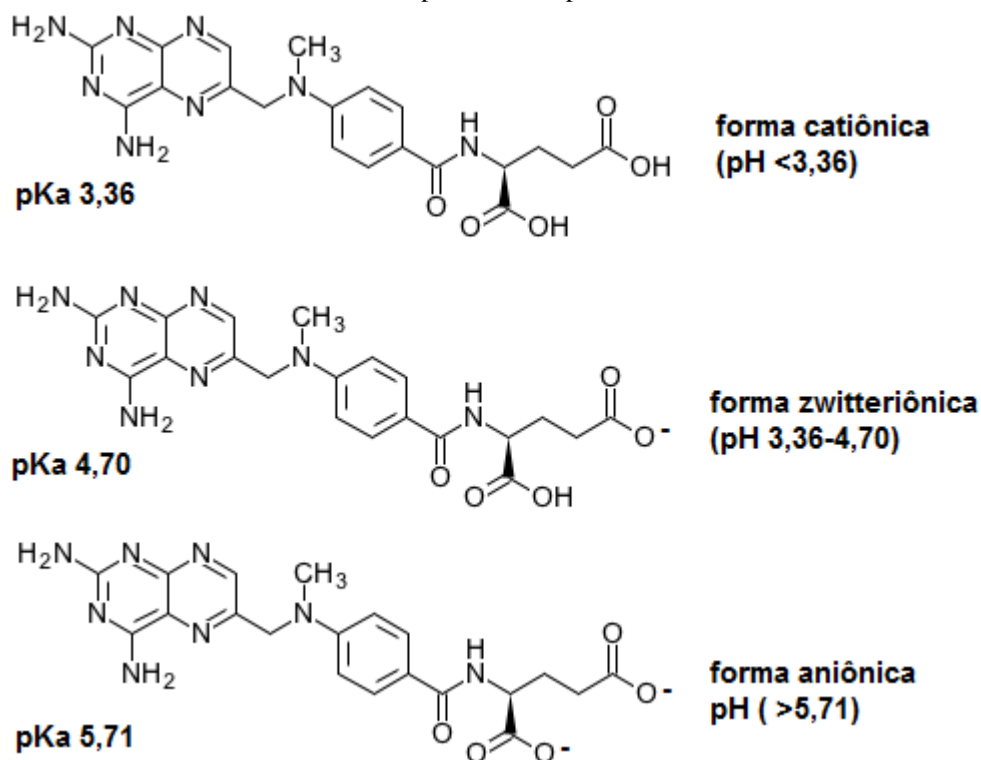
2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO METOTREXATO (MTX)

O MTX, ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilamino] benzoil] -L-glutâmico (C₆H₉N₃O₃), cuja estrutura química se encontra na Figura 2, é um pó cristalino alaranjado ou amarelo e higroscópico. Praticamente insolúvel em água e em álcool etílico. Facilmente solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos e carbonatos, pouco solúvel em solução de ácido clorídrico 6 M. Sua faixa de fusão é de 159°C a 163°C. Deve ser armazenado em recipientes bem fechados e protegidos da luz (FARMACOPEIA BRASILEIRA 6 ed., 2019).

De acordo com Santos *et al.* (2017), o MTX é solúvel em soluções alcalinas e ácidas, enquanto entre seus valores de pKa de 4,7 e 5,71, a sua solubilidade diminui, o que induz a precipitação (FIGURA 5).

O MTX é classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como Classe III onde apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade através de membranas biológicas de uso oral. Com esse sistema é possível avaliar e prever a absorção oral deste fármaco (DEZANI, 2017). É altamente polar (log P=-1,85), ou seja, com coeficiente de partição P<1 indicando afinidade preferencialmente pela fase aquosa (hidrofilia) sendo difícil de permear no estrato córneo. A hidrossolubilidade dependente do pH, a dissociação em condições fisiológicas de pH e alto peso molecular (454,44g/mol) faz com que o MTX seja considerado um fármaco de baixa permeabilidade (YANG; KAMIYA; GOTO, 2012), pois a presença de lipídeos no estrato córneo representa uma barreira lipofílica que restringe a permeação de moléculas (AMARJI *et al.*, 2015).

Figura 5 – MTX em diferentes formas iônicas dependendo do pH

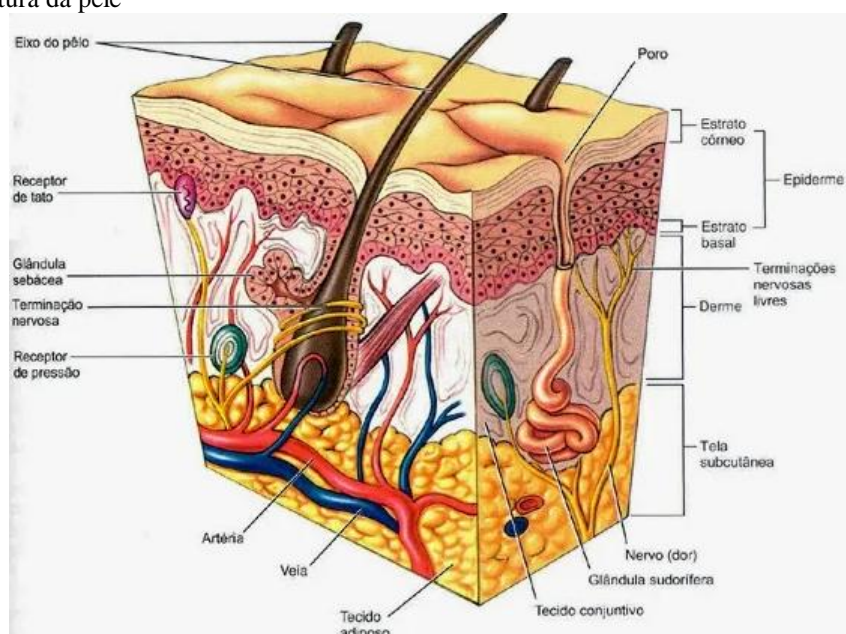


Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.* (2017).

2.4 ESTRUTURA DA PELE

A pele é um órgão constituído por vários estratos subdivididos em camadas tissulares distintas chamadas de epiderme e derme, cujas estruturas influenciam na permeação de fármacos. Representa cerca de 15% do peso corporal total de um adulto e tem uma área de superfície de aproximadamente 2 m² (SOARES *et al.*, 2015). É um órgão composto por duas camadas principais: epiderme e derme e possui várias funções importantes, incluindo: proteção de barreira física, vigilância imunológica, regulação térmica, proteção contra luz ultravioleta e retenção de água (FIGURA 6).

Figura 6 – Estrutura da pele



Fonte: CENFE. 2019. Disponível em: <https://cenfewc.com.br/faq/quais-sao-as-camadas-da-pele-e-suas-caracteristica/>. Acesso em: 10 de maio, 2020.

A epiderme é responsável pela proteção da barreira física contra fatores exógenos e retenção de água. É constituído principalmente por queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. Os queratinócitos formam a barreira física da pele à medida que se diferenciam terminalmente da camada basal ao estrato córneo (PALMER; DELOUISE, 2016).

Os queratinócitos são as principais células da camada basal e estão em maior quantidade. Sintetizam a queratina e, com o processo de migração para a superfície, sofrem transformações deixando no lugar, estruturas planas e firmes de queratina, formando a camada córnea ou queratinizada, garantindo a impermeabilização e evitando a desidratação (KASHIWABARA *et al.*, 2016).

O estrato córneo é composto por queratinócitos fisicamente mortos, e são mantidas juntas por uma rede de proteínas (por exemplo, queratina, filagrina e loricrina) e revestidas com uma camada de gordura (por exemplo, ceramidas, ácidos graxos, colesterol). O estrato córneo e as junções estreitas no estrato granuloso criam uma barreira impermeável à água que é impermeável à maioria das moléculas de fármacos acima de 500 kDa e hidrofílicas. Os melanócitos, também na epiderme, fornecem melanina aos queratinócitos para absorver e bloquear a radiação ultravioleta. As células de Langerhans, os macrófagos e as células dendríticas dérmicas examinam a derme em busca de patógenos e produtos químicos xenobióticos (PALMER; DELOUISE, 2016).

Abaixo da epiderme, existe a camada chamada derme. É uma camada composta de um tecido conjuntivo dividido em duas camadas, conjuntivo frouxo e conjuntivo denso. A derme perde espessura com o avançar dos anos, além de perder a capacidade vascular e diminuir a regeneração celular, o número de fibras elásticas e colágenas, resultando em rugas e ressecamento da pele (FAGNANI *et al.*, 2013).

A derme possui uma rede maior quando comparada às demais camadas da pele responsável pelo controle da temperatura corporal, irrigação da epiderme e promovendo a difusão de nutrientes e oxigênio para as camadas celulares mais profundas. As principais células da derme são os fibroblastos, que produzem grandes quantidades de fibras conjuntivas de colágeno, e elastina, garantindo a sustentação, a extensibilidade e a resistência da pele. Esta camada contém os receptores sensitivos da dor, da temperatura e do tato (KASHIWABARA *et al.*, 2016).

O tecido chamado de hipoderme fica situado abaixo da derme e serve para unir esta com os órgãos profundos do corpo. Tem como função a proteção dos órgãos e como reserva de energia além de também controlar a temperatura corporal. Tem na sua composição, células chamadas de adipócitos e sua espessura varia segundo a localização, o sexo e a idade. A hipoderme representa 15 a 30% do peso corporal (FAGNANI *et al.*, 2013; KASHIWABARA *et al.*, 2016).

A absorção de fármacos na pele é afetada por vários fatores, tais como espessura, temperatura, grau de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, raça, pH na superfície da pele e integridade do estrato córneo. Outros aspectos a serem levados em consideração são próprios da formulação, como a natureza do fármaco e o tipo de forma farmacêutica que interferem na absorção percutânea. O fluxo transdérmico é grandemente influenciado pelo coeficiente de partição e pela solubilidade em água, visto que moléculas de alta polaridade e de grande tamanho encontram dificuldade para penetrar na pele. As características ótimas para a absorção percutânea são, principalmente, baixo peso molecular e solubilidade adequada em meios hidrofílico e hidrofóbico (SILVA *et al.*, 2010).

2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICOS E TRANSDÉRMICOS

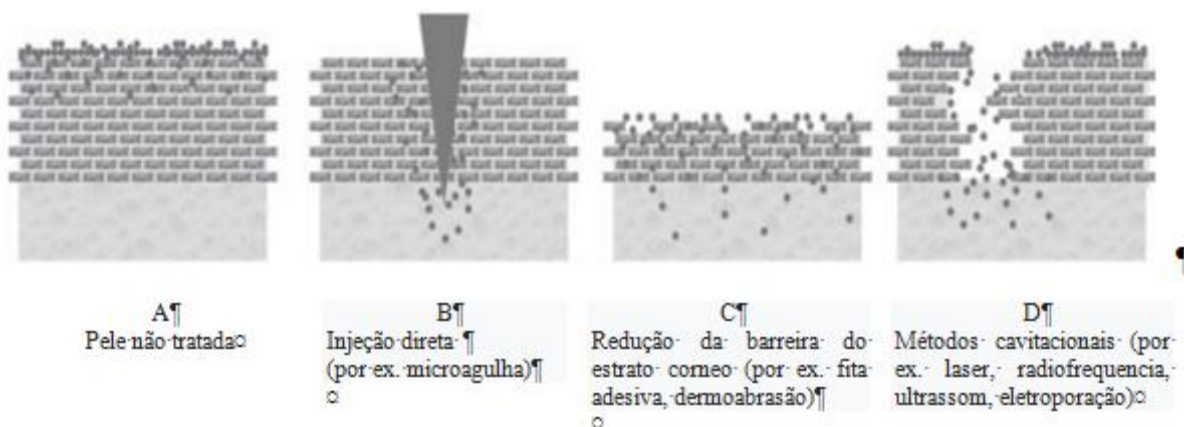
Um fármaco aplicado à superfície da pele ou seja, pela via tópica, tem três principais rotas de penetração na epiderme: através das glândulas sudoríparas, pelos folículos pilosos e glândulas sebáceas associadas, ou através do estrato córneo contínuo. A maioria dos compostos permeiam pela pele por uma combinação destas vias e a contribuição relativa de cada uma delas está relacionada à atividade físico-química e propriedades da molécula do fármaco. A liberação de compostos ativos à pele tem três objetivos diferentes: epidérmico, absorção tópica ou transdérmica. Cosméticos, repelentes de insetos e desinfetantes são exemplos de formulações comuns projetadas para manter o composto ativo na superfície da pele. As formulações tópicas permitem que o ativo penetre em profundidades regiões da pele. As formulações transdérmicas visam fornecer o ativo a circulação sistêmica (BENSON; WATKINSON, 2012; ZHU *et al.*, 2020).

Sistemas de liberação transdérmicos têm sido amplamente estudados nas últimas décadas, como uma alternativa atraente e valiosa para a administração oral e parenteral. As principais vantagens de liberação transdérmica são principalmente por não ser invasiva, dar conforto ao paciente, evita o metabolismo de primeira passagem, evitando sérios efeitos, e ignora as variáveis que afetam a absorção de fármacos no gastrointestinal. Apesar dessas vantagens óbvias de liberação transdérmica, o número de fármacos administrados por esta via é bastante limitado devido à função barreira de estrato córneo, a camada mais externa da epiderme da pele. Várias abordagens incluindo o uso de promotores de permeação, iontoforese, eletroporação, injeções e nanocarreadores estão sendo aplicados para aumentar a penetração de fármacos para superar a função de barreira da pele (ZEB *et al.*, 2016). Os principais objetivos são evitar administrações repetidas, ter liberação prolongada e manter as concentrações plasmáticas constantes. As vantagens da via transdérmica de administração de fármacos são: diminuir as variações plasmáticas de fármaco; diminuir a frequência de administração; anular a variabilidade da absorção oral; anular o metabolismo pré-sistêmico; possibilidade imediata de interromper a administração (MARTINS; VEIGA, 2002).

Em circunstâncias normais, onde a camada externa da pele, o estrato córneo permanece intacto, a via transdérmica é relativamente pequena e limitada a moléculas lipofílicas neutras com baixo peso molecular. Sem a manipulação de fórmulas modernas e o uso da tecnologia para obter melhorias na penetração, muitos fármacos e importantes peptídeos terapêuticos, como proteínas, não estariam disponíveis para administração tópica.

Os objetivos do aprimoramento da penetração incluem em aumentar a quantidade de substâncias possíveis de penetração e liberação transdérmica; aumentar a taxa de liberação transdérmica de substâncias específicas e direcioná-los para áreas específicas com reações cutâneas adversas mínimas. As estratégias para o aprimoramento da penetração vão desde a oclusão simples e a otimização da simulação até o uso de métodos / tecnologias químicas e físicas, ou combinações destes. Os vários métodos serão classificados mecanicamente, de acordo com seus efeitos sobre o estrato córneo da pele. Os métodos de injeção direta (por exemplo, microagulhas) penetram o estrato córneo fornecer uma substância ativa a uma profundidade predeterminada. Técnicas mecânicas, como a microdermoabrasão, melhoram a penetração por reduzir a espessura da barreira do estrato córneo, podendo causar um enfraquecimento geral da barreira. Tecnologias ablativas ou cavitacionais eliminam a barreira do estrato córneo em locais discretos, formando microporos ou microcanais através dos quais a difusão pode ocorrer. Finalmente, existem tecnologias como o ultrassom não-experimental, magnetoforese e iontoforese são projetadas para melhorar a penetração aumentando a força motriz de uma substância/ativo. A Figura 7 demonstra a penetração de substâncias aplicadas topicamente através da pele não tratada e após o tratamento com injeção direta, redução de barreira e tecnologias de cavitação (BENSON; WATKINSON, 2012).

Figura 7 - Penetração de substâncias aplicadas topicamente através da pele não tratada e após tratamento com injeção direta, redução de barreira e tecnologias de cavitação.



Fonte: Adaptado de BENSON; WATKINSON, (2012).

A via transdérmica, portanto, é explorada para tratamentos sistêmicos. Para tratamentos localizados na pele, a via tópica ou transepidérmica torna-se mais atraente, pois pode evitar o efeito sistêmico e efeitos adversos, além da diminuição da dose e menor exposição ao fármaco.

Para ação tópica do MTX deve-se levar em consideração seu mecanismo de ação ocorrer em células da derme, logo, o MTX hidrofílico precisa vencer o estrato córneo.

O uso de promotores de penetração pode contribuir para o transporte transepidérmico. Esses agentes interagem com os constituintes do estrato córneo tornando-o mais permeável a alguns compostos e induz um aumento temporário e reversível na permeabilidade da pele. Estes promotores são incorporados nas formulações de modo a melhorar a difusão e a solubilidade do fármaco na pele. (JAVADZADEHA *et al.*, 2011).

Considerando os importantes efeitos colaterais sistêmicos da terapia com MTX, como hepatotoxicidade, mielossupressão e fibrose pulmonar náusea, vômito, diarreia, estomatite e a ulceração cutânea (PINTO *et al.*, 2014; CINTRA *et al.*, 2016), uma maneira estratégica de minimizar essa toxicidade seria aplicação e ação localizada do fármaco. Neste sentido, este trabalho visou o desenvolvimento de sistemas tópicos, explorando sistemas tensoativos compostos por promotores de permeação, como também sistemas poliméricos alquilados geleificados.

2.6 FORMULAÇÕES COM BASE EM TENSOATIVOS

Emulsões são definidas como um sistema polifásico, no qual se encontra uma fase líquida (descontínua ou interna) é estabilizada em outra fase líquida (contínua ou externa) pela ação de um emulsionante. O comportamento de uma emulsão depende fortemente do tamanho das gotículas da fase dispersa. Para uma emulsão atingir estabilidade cinética, é necessária uma combinação adequada de ingredientes, de conhecimentos de química e de processos de fabricação (FRANZOL; REZENDE, 2015)

Além das emulsões convencionais, dependendo da composição, podem formar microemulsões (MEs) e cristais líquidos (CLs), que são termodinamicamente estáveis, se formam espontaneamente e possuem estrutura interna nanoestruturada, diferente das emulsões, que requerem energia para sua formação e suas gotículas internas é da ordem de micrômetros. A nanoestrutura confere vantagens como maior solubilização de ativos, melhor penetração através dos tecidos biológicos, facilidade no preparo devido à sua formação espontânea, o que facilita o escalonamento, além disso, suas propriedades adesivas abrem novos caminhos para o desenvolvimento de formulações bioadesivas que podem ser utilizadas em diferentes vias de administração oral, tópica, transdérmica, ocular, parenteral, vaginal e

retal (DAMASCENO *et al.*, 2011 ; CARVALHO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).).

Os CLs liotrópicos são ótimos veículos para aplicação localizada, pois fluem como líquidos e, em parte, mantém a estrutura dos sólidos cristalinos. O comportamento de fases dos tensoativos que estabilizam sistemas líquido-cristalinos e microemulsionados é extremamente atraente para o campo da nanotecnologia, porque as estruturas são estáveis e a sua produção pode variar a composição e agente tensoativo, a fase oleosa e a fase aquosa, e se pode verificar a viscosidade e a textura dos sistemas sendo possível modular a viscoelasticidade, a rigidez e a adesão de tais sistemas apenas alterando as proporções dos componentes. Portanto, os sistemas tensoativos tem grande potencial como sistemas de liberação tópica de fármacos (TANGSO *et al.*, 2014; DANCIU *et al.*, 2015; OYAFUSO *et al.*, 2015).

Os CLs podem ser classificados do tipo lamelar, hexagonal, cúbico (FIGURA 6). A estrutura interna também chamada de mesofase lamelar, é constituída por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo, separadas por camadas de solvente, formando uma rede uni ou bidimensional. A mesofase hexagonal, forma agregados por meio de arranjo de cilindros longos. A mesofase cúbica, no entanto, consiste em micelas normais ou reversas empacotadas em simetria cúbica ou bicontínua (JOHNSSON *et al.*, 2006; FARKAS *et al.*, 2007; CARVALHO, 2014).

Os CLs combinam benefícios de emulsões O/A e A/O, pois proporcionam a mesma condutância inicial da superfície da pele de uma emulsão O/A, e a mesma oclusividade de uma emulsão A/O, proporcionando aos CLs uma alta capacidade de retenção de água, promovendo hidratação imediata e duradoura do estrato córneo danificado. Devido à sua semelhança estrutural com os lipídios intercelulares do estrato córneo, os CLs oferecem as mesmas propriedades protetoras que os lipídios intercelulares naturais. Estes lipídeos formadores de cristais líquidos não são tóxicos e são biodegradáveis sendo usados em várias rotas de administração (SUZUKI *et al.*, 1993; IWAI; FUKASAWA; SUZUKI, 1998; CHEN; MA; GUI, 2014).

Sugere-se que a baixa umidade pode ser um fator essencial na exacerbação da psoríase pois há uma indução da hiperproliferação epidérmica, estado de desidratação da epiderme por perda da função, principalmente em lugares de clima frio e seco. Baseado em estudos *in vivo* em camundongos, foi possível observar que há diminuição do teor de lipídeos e aumento da espessura da camada epidérmica (KIM *et al.*, 2002).

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

Lopes *et al* (2006) afirmam que há um aumento da retenção cutânea ou penetração nas camadas mais profundas da pele com consequente liberação transdérmica de fármacos com aplicação tópica de sistemas líquido-cristalinos.

Em seus estudos, Cintra (2016) sugere que diversas formulações dentre elas os CLs que liberam MTX de maneira controlada se mostraram não citotóxicas, portanto, sugerindo que são interessantes para serem utilizados como novos sistemas para aplicação de MTX na pele.

Wonglertnirant *et al.*, (2012) mostraram que tensoativos aniônicos como lauril sulfato de sódio e bromamida de cetiltrimetilamônio aumentaram a permeação de fármacos, principalmente através de interações com lipídeos intercelulares no estrato córneo com a criação de um microambiente perturbado entre cadeias alquílicas lipídicas e grupos de cabeças polares.

O mecanismo de ação dos tensoativos aniônicos tendem a interagir bem com a queratina nos corneócitos, abrem a estrutura densa da queratina e a tornam mais permeável, e aumentam a absorção transdérmica pela desordem da camada lipídica do estrato córneo (SOM *et al.*, 2012). Quantidades crescentes de fármaco permeado resultaram em um aumento nas interações da membrana. No entanto, para escolher promotor de permeação cutânea, não se deve considerar apenas o aumento da permeação, mas também toxicidade e irritação.

Som *et al.* (2012) afirmam que os tensoativos catiônicos interagem com proteínas da pele via interações polares e ligação hidrofóbica. A interação hidrofóbica entre as cadeias de tensoativos catiônicos e proteínas resultam em grupos de cabeças iônicas pendentes e subsequente inchaço do estrato córneo. Estes são mais destrutivos para os tecidos da pele, causando um aumento maior no fluxo do que os tensoativos aniônicos.

Com relação aos tensoativos não iônicos, há dois possíveis mecanismos pelos quais a taxa de transporte e permeação de fármacos: o primeiro é que tensoativo pode penetrar nas regiões intercelulares do estrato córneo, aumentar a fluidez e, eventualmente, solubilizar e extrair componentes lipídicos; e o segundo mecanismo é pela penetração do tensoativo na matriz intercelular seguida de interação e ligação com os filamentos de queratina podendo resultar em uma ruptura dentro do corneócito. Além disso, os tensoativos não iônicos são capazes de emulsionar o sebo, aumentando assim o coeficiente termodinâmico dos fármacos e

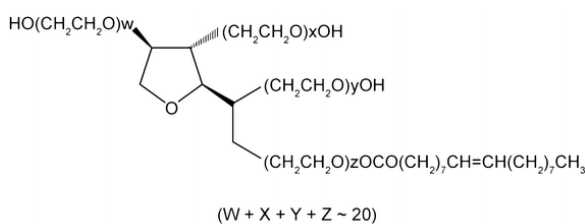
permitindo que ele penetre nas células com maior eficácia. Os polissorbatos, oferecem um meio de aumentar a permeação do fármaco através da pele sendo demonstrado um aumento significativo da permeação do fármaco até 13 vezes quando aplicada na pele do camundongo sem pelo (SOM *et al.*, 2012).

Na literatura, o emprego de MEs e CLs para administração cutânea de MTX é bem escassa, mas um estudo de Von Zuben (2012) evidenciou resultados promissores com o emprego da fase lamelar para o tratamento tópico da psoríase com MTX, apesar de ressaltar a importância de continuidade de estudos *in vivo*, avaliação da toxicidade e estudos clínicos a fim de comprovar a segurança, a estabilidade das formulações desenvolvidas e a obtenção de efeitos terapêuticos desejados com a utilização de doses menores do medicamento foram desenvolvidas. Este trabalho foi testado apenas com formulações de fase lamelar.

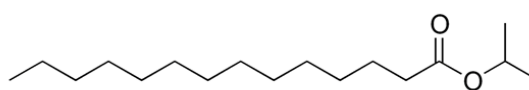
No presente trabalho estão sendo testadas formulações de fase lamelar e hexagonal, com outros componentes e tensoativos de custo mais acessível, e ainda hidrogéis, além da realização de testes *in vivo* para comprovação da eficácia e tratamento da psoríase.

A escolha dos componentes dos CLs como o Tween 80® e miristato de isopropila se deve à baixa toxicidade, facilidade de aquisição, baixo custo e a existência em grau farmacêutico (FIGURA 8). O Tween 80® é um tensoativo não iônico muito utilizado em formulações, interagindo com a pele causando um desarranjo estrutural lipídico, aumentando a permeabilidade da pele (RAFEIRO, 2013).

Figura 8 - Estruturas químicas: A: miristato de isopropila; B: polissorbato 80



Estrutura química do polissorbato 80



Estrutura química do miristato de isopropila

Fonte: Adaptado de FCIências (2020); SCHWARTZBERG; NAVARI, (2018)

O miristato de isopropila é uma substância líquida, praticamente inodora, e tem sido estudado e impulsionado como um intensificador de penetração na pele. Embora o miristato de isopropila tenha sido amplamente utilizado como um aprimorador seguro da permeação, surpreendentemente, seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido em detalhes, porém há

estudos que sugerem que o miristato de isopropila afeta os lipídios do estrato córneo e o coeficiente de partição entre o estrato córneo e o veículo (BENSON; WATKINSON, 2012).

2.7 HIDROGÉIS

São redes tridimensionais poliméricas que podem intumescer em meio aquoso e ainda são capazes de absorver grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver (DRESSLER, 2008). Os hidrogéis poliméricos são constituídos de cadeias macromoleculares interligadas por interações químicas e físicas, sendo os obtidos por reticulações físicas formadas por ligações reversíveis (interação iônica ou secundária), enquanto os químicos são formados por ligações irreversíveis (ligações covalentes) (CHAGAS, 2012; LIMÓN *et al.*, 2019).

Os hidrogéis apresentam características de hidrofiliabilidade as quais podem ser controladas pela natureza dos grupamentos presentes em suas cadeias, como: -OH, -COOH, -CONH₂, NH₂, SOH₃ (AOUADA, 2009). Devido a esses grupos funcionais, os hidrogéis são sensíveis às condições do ambiente como temperatura, composição do solvente e pH, o que conferirá propriedade físico-química únicas (DRESSLER, 2008). Eles possuem biocompatibilidade e baixa tensão interfacial com os fluidos biológicos e tecidos. A natureza viscoelástica dos hidrogéis minimiza a irritação mecânica e de fricção ao tecido das vizinhanças, não causam dor e dano à mucosa ou ao interior dos vasos sanguíneos, e nem risco de infecção. Essas características fazem com que os hidrogéis sejam aplicados na área biomédica, na regeneração de tecidos, em implantes e na área farmacêutica, para liberação controlada de fármacos e proteínas em locais específicos do organismo (ABREU, 2008).

A tixotropia ou mudança dependente do tempo na viscosidade é uma propriedade desejável para formulações farmacêuticas nos quesitos de flexibilidade na liberação de fármacos. Os hidrogéis são fáceis de aplicar na superfície da pele, resultando em alta adesão e tolerância do paciente. Os hidrogéis são tipicamente classificados como sistemas não-newtonianos que exibem relação não-linear entre a taxa de estresse e cisalhamento (ou deformação) (JAIN, 2016). As formulações tópicas tixotrópicas deformam-se durante a aplicação, isto é, tornam-se mais fluidas e conseqüentemente o espalhamento no local da aplicação é mais fácil. No final da aplicação, a perda do fármaco é evitada pela recuperação da viscosidade inicial.

O comportamento tixotrópico é caracterizado quando a reestruturação do gel ocorre lentamente. Em geral, a tixotropia de produtos semissólidos influencia no prazo de validade e na aplicação tópica e pode ser influenciada por vários fatores em um sistema de gel como pH, temperatura, modificação ou combinações de polímeros, adição de cátions ou ânions e concentrações de polímeros. (CID *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de sistemas de reservatórios mais convenientes é claramente desejável, e uma área notável de interesse tem sido o uso de hidrogéis contendo fármacos. Utilizar um hidrogel, ao invés de uma solução, facilita o tratamento de fármacos e permite ao paciente para permanecer ativo. Os hidrogéis atraíram cada vez mais a atenção nos últimos anos, em vista do seu comportamento de intumescimento, adesividade e biocompatibilidade. A incorporação de fármacos em hidrogéis permite a modulação de sua cinética de liberação (ALVAREZ-FIGUEROA, BLANCO-MENDEZ, 2001).

Há diversos tipos de hidrogéis utilizados para fabricação de formulações farmacêuticas. São vários os polímeros utilizados na formação desses hidrogéis, entre eles estão os polímeros naturais (alginato, quitosana, metilcelulose, xantana) e os polímeros sintéticos (álcool polivinílico, óxido de polietileno), podendo ter caráter aniônico, catiônico ou neutro, dando condições favoráveis para desenvolver sistemas de liberação de fármacos de aplicação tópica (CHAGAS, 2012; LIMÓN *et al.*, 2019).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina que é encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos. Devido ao caráter básico, atribuído à presença do grupamento amina nas unidades repetidas, e à sua biodegradabilidade, esses dois polímeros vem despertando bastante interesse de cientistas e tecnólogos, que têm descoberto diversas aplicações, especialmente na área biomédica (CANELLA; GARCIA, 2001). A quitosana é o polímero natural mais favorável para a formação de hidrogel termossensível, pois possui propriedades antibacterianas, biocompatíveis e biodegradáveis. É insolúvel em soluções neutras e alcalinas, mas é solúvel em ácidos diluídos como o ácido clorídrico, acético e perclórico onde os grupos amino são protonados (DEHSHAHRI *et al.*, 2021).

O polímero de carbono alquilado de nome comercial Pemulen® TR-2 é um emulsificante polimérico introduzido no final dos anos 1980 por B.F. Goodrich e agora produzido pela Noveon, uma subsidiária da Lubrizol. Na literatura da indústria cosmética, Pemulen TR-2 faz parte de uma classe de copolímeros referidos como polímeros cruzados de acrilato / C10-30 alquil acrilato. Consiste em um ácido poli acrílico semelhante ao Carbopol®, reticuladas com um metacrilato de cadeia longa. Assim, este polímero possui regiões lipolíticas (o metacrilato) bem como regiões hidrofílicas (o ácido acrílico). Essas

regiões de afinidade diferente permitem que Pemulen® TR-2 atua como um emulsificante primário, ou seja, pode ser usado para fazer óleo em emulsões de água (O / W) sem a adição de sabão ou surfactante. Os géis feitos com Pemulen TR-2 são mais viscosos no pH intervalo de 5-9 (RAVENEL, 2010).

A hidroxipropilemetilcelulose (HPMC) é um polímero derivado da celulose com alta capacidade de molhagem e alta velocidade de hidratação. É largamente utilizado como um excipiente, em formulações farmacêuticas orais e tópicas como agente gelificante e em produtos cosméticos e alimentares. É um polímero hidrosolúvel não iônico, não tóxico e não irritante. Está disponível em vários tipos e viscosidades. O HPMC é utilizado também como agente emulsificante, suspensor e estabilizante para gel (SALGADO, 2008).

Alvarez-Figueroa; Blanco-Mendez (2001) testou microemulsões e hidrogéis contendo ácido acrílico e acrilamida (combinados ou não) além de tensoativos e co-tensoativos, componentes de fase oleosa e MTX para a administração tópica no tratamento da psoríase. Os testes foram feitos in vitro, onde o MTX foi incorporado no hidrogel na concentração de 120 e 200 mg/mL testando o fármaco saturado na permeação por difusão passiva e a associação de iontoforese para otimizar a permeação. A eficácia do MTX é observada, mas o estudo sugere a administração tópica deste medicamento desde que utilize as concentrações ideais de MTX nas formulações para tratamento da psoríase nos hidrogéis.

Kumar, Sandhu e Kaur (2004) testaram um hidrogel de MTX tópico a 0,25% (Rextop; Systopic Laboratories, Índia) em pacientes com lesão palmoplantar. Quatorze pacientes adultos foram incluídos no estudo, onde foi aplicado duas vezes ao dia nas lesões por 12 semanas. As lesões foram avaliadas quanto ao grau de eritema, descamação, endurecimento e infiltração, e foram pontuadas com uma pontuação de gravidade de 0–3 (0, ausente; 1, leve; 2, moderada; 3, grave) a cada 2 semanas. O tempo médio para melhoria foi de pelo menos 6 semanas. Nenhum dos pacientes apresentou melhora completa das lesões. O MTX 0,25% em gel hidrofílico é bem tolerado, mas não é muito eficaz no controle das lesões da psoríase palmoplantar. Uma concentração mais alta em uma base diferente com melhor penetração poderia fornecer melhores resultados.

O medicamento Rextop Gel 1% auxilia na inibição das células da pele que estão em crescente proliferação. Destina-se apenas a uso externo e deve ser usado conforme recomendado pelo médico. O tempo médio de melhora é de pelo menos seis semanas. Apesar da boa tolerância da formulação, não é muito eficaz no controle das lesões da psoríase palmoplantar. Além de efeitos colaterais como náusea, vômito, perda de apetite e dor abdominal, há também incompatibilidades que devem ser observadas (REXTOP GEL, 2020).

Outros dois medicamentos similares de uso tópico contendo metotrexato são comercializados na Índia com nomes comerciais: Dermotrex Gel 1% p/p (East West Pharma Ltd.) e Trexjoy Gel 1% p/p (Intas Pharmaceuticals Ltd.). São utilizados para tratar a psoríase, quando outros tratamentos não são eficazes. Estes medicamentos não são recomendados durante a gravidez ou durante a amamentação (DERMOTREX, 2020; TREXJOX, 2020).

Estudos de Eskicirak.B, Zemheri E. e Cerkezoglu A. (2006) tiveram como objetivo avaliar a eficácia e tolerabilidade do gel de MTX tópico a 1% de hidroximetilcelulose e placebo (pomada de vaselina) como tratamento para a psoríase com 40 pacientes com psoríase crônica do tipo placa, duas vezes ao dia por 8 semanas. As lesões foram pontuadas na linha de base e após 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento para eritema, descamação e infiltração. A melhora global e características histopatológicas também foram avaliadas após o tratamento com MTX. Os resultados no final do tratamento, o eritema foi totalmente eliminado em 47,5% dos pacientes tratados com MTX e 7,5% daqueles tratados com placebo. A melhora da infiltração foi de 22% dos pacientes tratados com MTX e 2,5% dos pacientes tratados com placebo ($P < 0,01$). A melhora clínica foi quase a mesma para os dois grupos em relação à descamação ($P < 0,5$). A melhoria global foi de 97% para pacientes tratados com metotrexato e 60% para aqueles tratados com placebo com uma diferença significativa entre os grupos ($P < 0,01$). Uma melhoria histopatológica foi alcançada no grupo tratado com MTX ($P < 0,01$). Não foram observados efeitos colaterais, concluindo que este estudo sugere que o MTX a 1% em um gel hidrofílico é bem tolerado e significativamente mais eficaz que o placebo como medicamento tópico para o tratamento de psoríase vulgar.

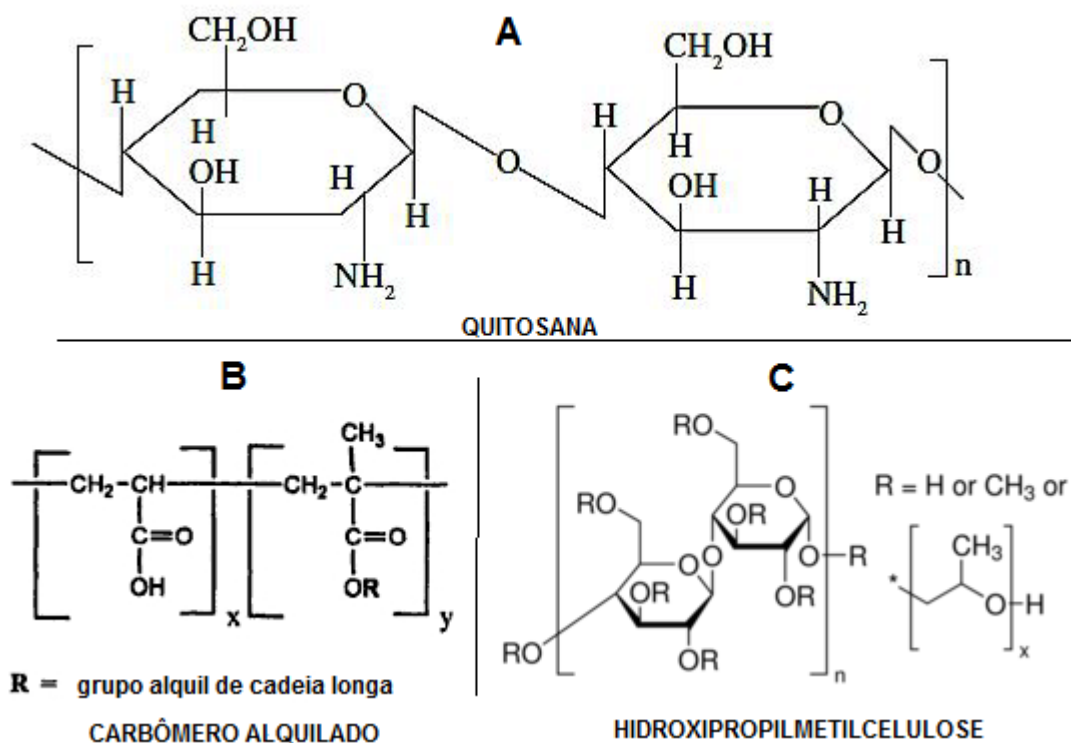
O estudo envolveu a preparação de 0,25% MTX niossomal incorporado em gel de quitosana visando aumentar a penetração percutânea e a eficácia terapêutica avaliando quanto à irritação e sensibilização em 10 voluntários humanos na fase I e 30 voluntários na fase II, seguido pela eficácia do gel calculada pelo método PASI. Um estudo duplo-cego controlado por placebo em pacientes com psoríase pela comparação de sua eficácia com um gel de MTX (Rextop®, Systopic, India) e o MTX niossomal mostraram que na 12ª semana o gel de metotrexato niossomal é mais eficaz que o placebo e o gel de MTX comercializado em termos de eficácia clínica, tolerabilidade e adesão do paciente com melhor absorção e penetração do MTX na pele sendo aplicado 1 vez ao dia. Os autores afirmam que embora os resultados tenham sido encorajadores, um número maior de pacientes com um estudo multicêntrico precisa ser realizado para concluir a eficácia da nova formulação (LAKSHMI *et al.*, 2007).

Syed *et al* (2001) testou MTX in vivo num estudo duplo-cego controlado por placebo com o objetivo de avaliar a eficácia clínica e a tolerabilidade do MTX 0,25% incorporado em

um gel hidrofílico (hidroxietilcelulose a 1%) no tratamento de pacientes com psoríase vulgar. Os voluntários passaram por avaliação utilizando o índice PASI para avaliar a gravidade das lesões psoriáticas, além de métodos clínicos e histopatológicos. O medicamento experimental foi aplicado às lesões duas vezes ao dia por 5 dias / semana por 12 semanas. O tratamento foi bem tolerado por todos os pacientes, sem sintomas adversos e após os testes os voluntários foram acompanhados por 12 meses a partir do primeiro dia do tratamento. Os resultados deste estudo demonstram que o MTX 0,25% em um gel hidrofílico é bem tolerado e significativamente mais eficaz que o placebo como medicamento tópico aplicado pelo paciente no tratamento da psoríase vulgar.

Jabur *et al.* (2009) testaram um hidrogel de carboximetilcelulose com MTX 0,5% v/v contendo glicerina, metilparabeno e dimetilformamida (promotor de absorção). Estes testes foram feitos em 65 voluntários divididos em 2 grupos: com o hidrogel de MTX e com hidrogel placebo. Após anamnese para avaliar os critérios de inclusão e exclusão, os voluntários foram instruídos a utilizar o produto 1 vez ao dia durante 8 semanas. As análises foram feitas a cada 2 semanas pelo índice PASI e observaram que houve redução da porcentagem média da pontuação PASI, portanto foi detectada a melhora da psoríase. Foi possível concluir que a composição do hidrogel base pode influenciar no resultado de permeação do fármaco e que o este é eficaz no tratamento de psoríase em placas com efeitos colaterais transitórios, que desaparecem com a descontinuação da terapia. Sugerem-se mais estudos com maior número de pacientes para estabelecer a concentração efetiva correta de MTX base de hidrogel além de compreender melhor o mecanismo de ação exato para MTX tópico.

Figura 9 - Estruturas químicas: A: quitosana; B: carbono alquilado; C: hidroxipropilmetilcelulose



Fonte: Adaptado de ResearchGate GmbH (2020); PBworks, Inc (2020).

O presente estudo visa testar *in vitro* e *in vivo* a aplicação tópica de MTX para psoríase na tentativa de avaliar a eficácia do fármaco em cristais líquidos e hidrogéis de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), gel de carbono alquilado (Pemulen[®]) e quitosana (FIGURA 9), com o objetivo de testar géis aniônicos, catiônicos e aniônicos alquilados como veículos para aplicação tópica do MTX.

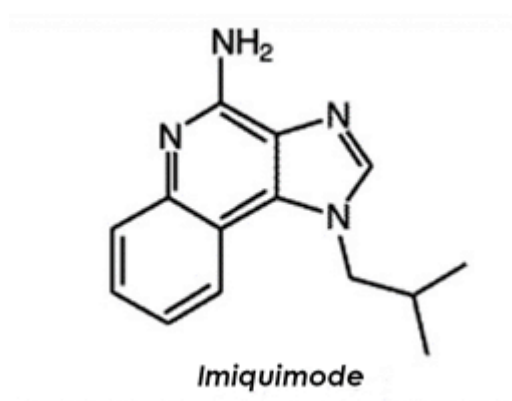
2.8 MODELO DE INDUÇÃO DE PSORÍASE

De acordo com Sponchiado (2015), alguns pacientes relatam que após o uso tópico prolongado de imiquimode (IMQ) aparecem lesões psoriáticas na região da aplicação e em outros locais no corpo.

Fits *et al.* (2009) caracterizaram o modelo de múltipla aplicação, com o objetivo de psoríase induzida pela aplicação tópica de IMQ em camundongos, ficando comprovada a validade desse modelo como ferramenta de pesquisa em estudos pré-clínicos de fármacos antipsoriáticos (SPONCHIADO, 2015).

O IMQ é uma imidazoquinolina amina cuja estrutura química (1- (2-metilpropil)-1H-imidazol [4;5-C] quinolina 4 amina) e fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_4$. É o primeiro membro da família das imidazoquinolinas (MACEDO, CARNEIRO; MATAYOSHI, 2007).

Figura 10 - Estrutura molecular do Imiquimode



Fonte: MACEDO, CARNEIRO; MATAYOSHI (2017)

O IMQ (FIGURA 10) é um modificador da resposta imune local de uso tópico indicado no tratamento de verrugas externas da região genital e anal, conhecidas como Condiloma acuminado, uma doença sexualmente transmissível provocada por vírus (papiloma vírus humano – HPV), em pacientes com idade igual ou superior a 12 anos; *Ceratose actínica* em adultos com sistema imunológico normal causado por exposição excessiva ao sol; *Carcinoma basocelular superficial* em adultos com sistema imunológico normal, quando um método cirúrgico é menos apropriado (NETO, 2002; IMIQUIMODE, 2019)

Nos estudos de Amarji *et al* (2015), utilizou-se a aplicação tópica de IMQ creme a 5% para induzir a psoríase e dermatite em camundongos para avaliação de fármacos antipsoriáticos como o MTX. Outros testes como o de dermatite de contato e de sensibilização da pele complementam os estudos para a comprovação da eficácia de formulações. Após a indução com IMQ houve a observação clínica das queratoses actínicas e superficiais nos camundongos C57BL/6 (8-11 semanas de vida). A aplicação tópica foi por 5 dias consecutivos sobre as costas raspadas dos camundongos. Para a indução de inflamação cutânea, a dose utilizada IMQ aplicada foi de 4 mg/dia. A dexametasona 0,1% creme (p/p) foi usada como controle positivo (CP). As formulações testadas também foram aplicadas topicamente durante 5 dias, uma vez ao dia na área da pele inflamada. A gravidade da inflamação foi monitorada diariamente usando Area Padrão de Psoríase e Índice de Gravidade (PASI).

Lin *et al.* (2015) também demonstrou em sua pesquisa que o IMQ induz a psoríase na pele em camundongos e afirma que este é um modelo que serve para investigar a atividade *in vivo* do fluxo dos fármacos na pele psoriática em comparação com a pele saudável.

Rajitha P. e Sabitha, M. (2017) testaram a permeação do MTX *in vitro* e *in vivo* em diferentes formulações (solução, nanogel de quitosana e gel de carbopol). Nos estudos *in vivo*, utilizou-se o IMQ para indução da psoríase em camundongos BALB/C. A severidade da inflamação foi medida por índice de gravidade (PASI).

É possível verificar que o modelo de indução da psoríase por IMQ em modelos animais é muito utilizado, pois a dermatite causada na pele do animal se assemelha a uma inflamação, irritação e descamação da doença a ser estudada. Assim, diversos fármacos podem ser testados por via tópica na busca de formulações menos agressivas e eficazes.

2.9 ÍNDICE DA GRAVIDADE DA PSORÍASE POR ÁREA (PASI)

O PASI é utilizado tanto em estudos clínicos, para avaliar a eficácia de novos medicamentos, quanto no dia-a-dia dos consultórios médicos. Em geral, os médicos calculam o PASI dos pacientes antes, durante e depois do tratamento, para que possam avaliar se houve melhora, em quanto tempo e se o tratamento está sendo eficaz. O acompanhamento do PASI é também fundamental para avaliar a necessidade de uma mudança no tratamento (BRASIL, 2013)

A avaliação da extensão da psoríase pode ser realizada por meio de um instrumento chamado Psoriasis Área and Severity Index (PASI). Trata-se de uma estimativa subjetiva calculada pelo profissional avaliador. O corpo é esquematicamente dividido em quatro regiões: membros inferiores, membros superiores, tronco e cabeça. Para cada uma delas, são avaliados três parâmetros: eritema (vermelhidão), infiltração (espessura) e descamação (QUADRO 1). A pontuação desses fatores é multiplicada pela extensão da doença em cada região e, posteriormente, também pela porcentagem de superfície corporal que aquela região representa. Ao final, os dados de cada região são somados podendo ter resultados de 0-72 (grau máximo de doença) (QUADRO 2). Esse instrumento permite estratificar a gravidade da psoríase em leve a moderada (PASI inferior a 12) e grave (PASI igual ou superior a 12) e tem sido utilizado como desfecho principal de estudos clínicos que avaliam eficácia de tratamentos para psoríase pela comparação dos resultados obtidos antes, durante e após as

intervenções. O índice mais frequentemente utilizado para documentar a efetividade de terapias individuais para psoríase extensa é o PASI-75 que representa melhora superior a 75% do escore medido pelo PASI. O PASI é considerado menos sensível em pacientes com acometimento de menos de 10% da superfície corporal e é pouco utilizado na prática clínica por sua complexidade, porém é o desfecho de escolha dos estudos mais relevantes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).

Quadro 1 – Índice de Gravidade e Extensão das Lesões Psoriáticas Utilizadas para Cálculo do PASI

EXTENSÃO	ÍNDICE DE GRAVIDADE (Soma dos Escores de eritema, infiltração e descamação)		
	0 (ausente)		
1 (abaixo de 10%)	Eritema	Infiltração	Descamação
2 (10%-30%)	0 (ausente)	0 (ausente)	0 (ausente)
3 (30%-50%)	1 (leve)	1 (leve)	1 (leve)
4 (50%-70%)	2(moderado)	2(moderado)	2(moderado)
5 (70%-90%)	3 (intenso)	3 (intenso)	3 (intenso)
6 (acima de 90%)	4 (muito intenso)	4 (muito intenso)	4 (muito intenso)

Fonte: Adaptado de Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Psoríase (2019).

Quadro 2 – Cálculo do Psoriasis Areaand Severity Index (PASI)

REGIÃO	PSC*	EXTENSÃO** (E)	ÍNDICE DE GRAVIDADE** (IG)	ÍNDICE DE PASI DA REGIÃO (PSC) x (E) x (IG)
Cabeça	0,1			
Tronco	0,2			
Membros superiores	0,3			
Membros inferiores	0,4			
PASI TOTAL (soma dos PASI das regiões)				

Fonte: Adaptado de PSORÍASE – AVALIANDO O TRATAMENTO (2019)

Legenda: *Porcentagem da superfície corporal (0,1=10%;0,2=20%;0,3=30%;0,4=40%

**Baseado no Quadro 2

O termo “PASI” associado aos números 50, 75, 90 ou 100 faz referência ao percentual de redução da gravidade da psoríase em resposta ao tratamento. Então, quando o paciente alcançou PASI 90, significa que a psoríase melhorou pelo menos 90% em comparação ao início do tratamento ou à medida de PASI anterior. Para fins de tratamento, a psoríase pode ser dividida em leve ou moderada (igual ou superior a 19% da superfície corporal ou escore PASI inferior a 12) e grave (igual ou superior a 20% da superfície corporal ou escore PASI igual ou superior a 12) (PSORÍASE – AVALIANDO O TRATAMENTO, 2019).

Tendo em vista o estabelecimento de modelos animais prévios para psoríase induzida por IMQ e o PASI como um método bem estabelecido para diagnosticar a psoríase, este

trabalho tem como objetivo usar estas ferramentas como prova de princípio para avaliar a eficácia tópica dos sistemas propostos neste trabalho.

3 OBJETIVO

Desenvolver sistemas tópicos para ação cutânea do MTX no tratamento da psoríase, explorando sistemas estabilizados por tensoativos e hidrogéis como veículos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o comportamento de fases de sistemas baseados em tensoativos pela construção de diagrama de fases;
- Desenvolver hidrogéis e avaliar a solubilidade do MTX,
- Determinar a capacidade de incorporação e estabilização do fármaco nos sistemas,
- Caracterizar as formulações por meio de análises físico-químicas como microscopia de luz polarizada, análise reológica, análise de textura e bioadesão em pele de orelha suína;
- Avaliar o perfil de liberação do MTX *in vitro* a partir dos sistemas de liberação desenvolvidos nas diferentes formulações;
- Realizar prova de conceito das formulações por meio de estudos *in vivo* com modelo animal, utilizando camundongos suíços e indução da dermatite psoriática para avaliação das formulações selecionadas a partir dos estudos *in vitro*.

4 MATERIAIS

4.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos AP56 Phoenix, Araraquara-SP, Brasil

Agitador magnético MULTISTIRRER, F203A0177, Velp Scientifica, Europa

Agitador magnético Multistirrer, Velp Scientifica, Itália

Agitador Vortex VX-38 Even

Analizador de textura TATX Plus Stable Micro Systems®;Brasil

Balança analítica modelo AUY 220 Shimadzu®

Balança semi-analítica modelo 3200A, Even

Banho de ultrassom, Unique, Brasil

Banho Maria Hemoquímica®;

Banho Ultrassom Unique®

Bomba de vácuo Solab Modelo SL61, Brasil.

Bomba de vácuo, Primatec, Série 5255, Brasil.

Células de difusão tipo Franz, Hanson Research Corporation®, Chatsworth, Estados Unidos

Centrifuga Celm Modelo LS-3plus

CLAE marca Shimadzu (LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A, módulo de comunicação CBM-20A, autoamostrador SIL-20AHT, Shimadzu). Kioto, Japão.

Coluna cromatográfica LiChrosphere 100 RP-18 (150x4,6d.i.) com partículas de 5µm, Alemanha.

Espectrofotômetro UV-Vis 2401-PC, Shimadzu

Espectrofotômetro UV-Vis UV-M51, Bel Photonics

Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, UK

ELx50, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA

Medidor de pH MS Tecnopon Instrumentação® modelo mPA-210; Brasil

Microscópio de Luz Polarizada AXIOPHOT Zeiss, Alemanha

Microscópio SZ61 acoplado com acessório de fixação polarizado simples S0214, Olympus

Panela de pressão elétrica MONDIAL, Modelo PE-12, Brasil

pHmetro Tecnopon Modelo mPA-210

pHmetro Digimed DM-22, Brasil

Reômetro MARS II, Haake®

Sistema Millipore® para purificação de água (Milli Q Plus).
Toupcam Industrial Digital Camera UCMOS05100KPA, China
Stable Micro Systems Texture Analyser, TA-XT Express, Reino Unido.
TURRAX Modelo MA102

4.2 LISTA DE MATERIAIS

Acetato de sódio tri-hidratado, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil
Acetonitrila, Merck, Alemanha
Ácido acético glacial, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil
Ácido clorídrico, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil
Ácido fórmico 88%, Biotec Reagentes Analíticos, Pinhais, Brasil
Adjuvante Completo de Freund, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos
Água Milli-Q
Anasedan solução injetável (xilazina 2%), Ceva, Paulínia, Brasil
Dopalen solução injetável (ketamina 10%), Ceva, Paulínia, Brasil
Fosfato de potássio monobásico PA, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, Brasil
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado PA, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil
Hidróxido de sódio, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil
Hidroxipropil metilcelulose ftalato (tipo HP-55), Shin Etsu, Tóquio, Japão
Membrana Spectra/Por molecularporous, Spectrum, Rancho Dominguez, Canadá
Metanol, Panreac Química SLU, Barcelona, Espanha
Metotrexato, Fermion, OY-Finlândia
Miristato de isopropila, Synth, Diadema-SP, Brazil
PARAFILM, BEMIS PM-996, USA
PEMULEN® TR-1NF Polymeric emulsifier, Lubrizol, Cleveland, USA.
Polissobato 80, TWEEN 80, Synth, Diadema-SP, Brasil
Quitosana de baixa viscosidade, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos

5. METODOLOGIA

5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO MTX POR ESPECTROSCOPIA UV

Para a construção da curva analítica foram preparados soluções-padrão em metanol nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 20 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata, e avaliadas em espectrofotômetro. Com base em estudos anteriores de LIU, X *et al.* (2009), WU, H. (2007), WANG, X. *et al.* (2014), o MTX foi analisado no comprimento de onda de 306 nm. Foi determinada a regressão linear, a linearidade através do coeficiente de correlação, precisão, exatidão, repetibilidade, limite de detecção e quantificação.

5.2 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX EM DIFERENTES pHs

Foram preparadas soluções aquosas em diferentes pHs: 3; 4,5 e 7 em tubos de ensaio onde foi adicionado 30 mg/mL de MTX, agitados por 24 horas em agitador de tubos e em seguida foram centrifugados por 20 minutos a 3400 rpm em centrífuga Celm Modelo LS-3Plus. Após este procedimento, a amostra ficou em repouso por 24 horas. O sobrenadante foi retirado e diluído em metanol para leitura em Espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS UV – M51) a 306 nm para leitura da concentração do MTX.

5.3 OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS

Foram obtidos três hidrogéis em diferentes pHs – 3,0; 4,5 e 7,4 - com o objetivo de se obter formulações em que as três diferentes formas iônicas do MTX prevaleçam: em pH=3,0 a forma catiônica, em pH=4,5 a forma zwitteriônica e em pH=7,4 a forma aniônica. Para isso, foram empregados diferentes polímeros, cuja solubilidade é mais adequada para cada faixa de pH.

Para o hidrogel com pH=3,0, foi selecionada a quitosana de baixa viscosidade (Sigma Aldrich), um polímero catiônico, na concentração de a 10% p/p. Para incorporação do MTX, o fármaco foi previamente dissolvido em ácido acético 0,1M, com a posterior adição do polímero e agitação até completa dispersão. Este sistema foi nomeado de HQS (hidrogel de quitosana).

O hidrogel em pH=4,5 foi preparado com hidroxipropilmetilcelulose 100 cP (Sigma Aldrich), um polímero não iônico, a 10% p/p. Para seu preparo, o fármaco foi solubilizado em água com a posterior adição do polímero até completa dispersão e ajuste do pH com ácido acético 0,1 M. Este sistema foi nomeado de HHPMC (hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose).

O hidrogel com pH=7,4 foi preparado com carbômero alquilado C10-C30 (Pemulen[®], Lubrizol), um polímero aniônico, a 2% p/p. Seu preparo foi realizado com a completa dispersão do polímero em tampão fosfato 0,01 M (pH 7,4), usando agitador magnético para dispersão e solubilização do MTX no gel. Este sistema foi nomeado como HCA (hidrogel de carbômero alquilado).

Para cada sistema, o MTX foi adicionado na concentração obtida no ensaio de solubilidade em seus respectivos pHs.

5.4 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASE TERNÁRIO DOS SISTEMAS CONTENDO TENSOATIVO, ÓLEO E ÁGUA (CRISTAIS LÍQUIDOS)

O diagrama de fase ternário foi obtido pela titulação aquosa das misturas contendo o tensoativo Tween[®] 80 (polissorbato 80) e fase oleosa miristato de isopropila nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Um volume de 500µL de água purificada foi adicionado paulatinamente com uma micropipeta. Após cada adição, os sistemas foram homogeneizados e mantidos em repouso por 24 h. Em caso de formação de bolhas, este tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas ser observado. As mudanças de fases foram identificadas visualmente sendo os sistemas classificados como Sistemas Líquidos Transparentes, Sistemas Viscosos Transparentes e Separação de Fases. O percentual (%p/p) de cada componente foi calculado para a construção do diagrama de fases ternário, utilizado o software Sigma Plot 10.

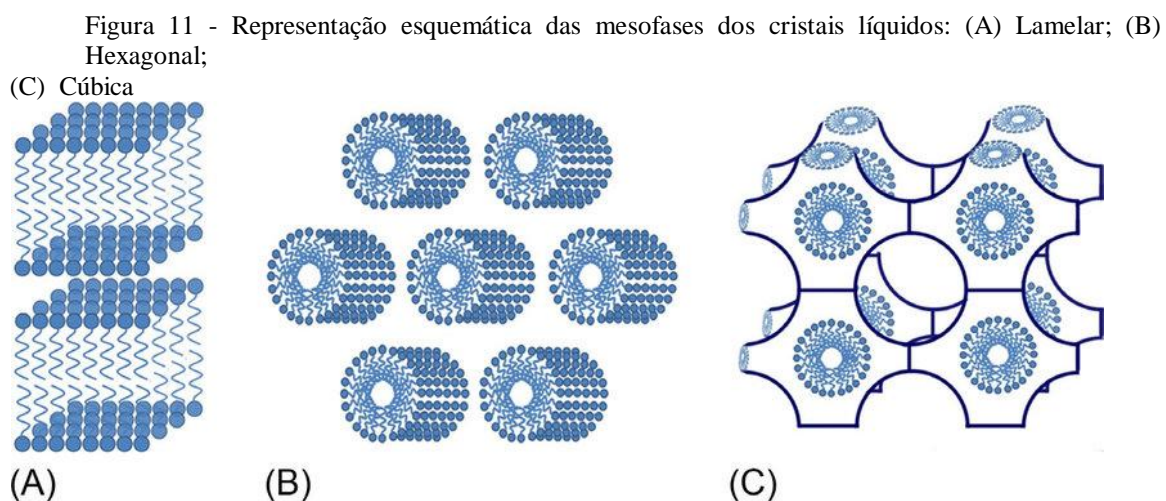
5.4.1 Incorporação do MTX nos Sistemas Líquido Cristalinos

Os Cls são formados espontaneamente por meio de mistura simples dos componentes. Os componentes polissorbato 80 e o miristato de isopropila foram pesados em um pequeno béquer e em seguida foi adicionado uma quantidade de solução mãe de MTX equivalente a 2mg/mL. Acertou-se o volume com solução tampão fosfato 0,01 M. Ajustou-se o pH para 7,4 com solução de NaOH 1 M e agitou-se utilizando bastão de vidro até total incorporação dos componentes. Após identificação, as formulações foram armazenadas em frascos de vidro fechados e ao abrigo da luz e calor.

5.5 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP)

A caracterização por MLP foi realizada utilizando um microscópio de luz polarizada (Microscópio SZ61 acoplado com acessório de fixação polarizado simples S0214, Olympus) localizado no Laboratório Multiusuários da UNIFAL/MG.

Uma quantidade de cerca de 50 mg das formulações foi colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas no microscópio, em laboratório climatizado. Com esta técnica foi possível classificar os sistemas quanto à isotropia e anisotropia, e auxiliar na identificação das mesofases (GOODBY *et al.*, 1998). As mesofases internas nanométricas formadas foram classificadas e fotografadas para comparação (FIGURA 11).



Fonte: Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-A-lamellar-B-hexagonal-and-C-cubic-liquid-crystal_fig9_322173866. Acesso em: 31 julh. 2020.

5.6 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA POR ENSAIOS DE FLUXO CONTÍNUO E ENSAIOS OSCILATÓRIOS DE VARREDURA DE FREQUÊNCIA

As medidas reológicas foram realizadas em parceria com UEM – Universidade Estadual de Maringá. Utilizando um Reômetro MARS II, no modo oscilatório. A análise oscilatória dos sistemas foi realizada 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. A RVL é caracterizada como a região onde a tensão e a deformação são diretamente proporcional e o módulo de estocagem, ou elástico (G') permanece constante. Uma deformação dentro da RVL foi selecionada para subseqüentes análises de varredura de frequência. 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 (BRUSCHI, M. L. *et al.*, 2007; DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2017). Um intervalo de frequência de 0,1 a 10,0 Hz, foi analisado para cada amostra. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso (G'') e a viscosidade dinâmica (η') foram determinados utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake[®]). Experimentalmente, o primeiro ponto de coleta de dado gerado pelo reômetro a 0,1 Hz está sujeito a artefatos do instrumento e, assim, será tratado com cautela.

O estudo reológico representa uma técnica eficiente para caracterizar propriedades estruturais de diferentes materiais (AMORIM, 2012; DINU *et al.*, 2012). As propriedades reológicas influenciam no processo de desenvolvimento de produtos, seja na área farmacêutica, cosmética ou química, sendo possível avaliar o comportamento destes materiais em relação aos parâmetros de escoamento, remoção da embalagem e aplicação no local de ação (LEE *et al.*, 2009).

5.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)

A avaliação do perfil de textura foi realizada utilizando um analisador de textura TAXTplus disponível no Departamento de Alimentos e Medicamentos da UNIFAL-MG, pelo teste conhecido como TPA (Texture Profile Analysis).

Este teste consiste em dois ciclos de compressão da amostra com os quais é possível obter características mecânicas, como dureza, resistência à compressão, coesão e adesão. Estes atributos são desejáveis nas formulações que contribuem para a aceitabilidade final do usuário da formulação incluindo ótimas propriedades mecânicas como a facilidade de remoção do produto a partir do recipiente, boa espalhabilidade na pele ou mucosa, boa bioadesão para assegurar a retenção no local da aplicação, viscosidade aceitável e, consequentemente a influência na liberação e absorção dos fármacos (CINTRA *et al.*, 2013)..

No modo TPA, utiliza-se cerca de 10g de amostra em um tubo Falcon de 50 ml, onde a prova analítica é disposta cerca de 5 cm acima da superfície da amostra, desce numa velocidade constante de 5 mm/s, penetra na amostra numa profundidade de 10 mm e volta até a sua superfície. Após este primeiro ciclo, 5 segundos depois se inicia a segunda compressão. Durante os dois ciclos de compressão, o software Texture Exponent Lite do equipamento constrói a curva de força versus tempo com a qual é possível obter os parâmetros mecânicos. As amostras foram analisadas em temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Para a análise estatística, os dados paramétricos foram analisados pela ANOVA seguida de pós-teste de Newman-keuls, utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, La Jolla, C.A). Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis empregando-se o software R versão 4.0.2 usando o pacote Agricolae (DE MENDIBURU, 2017).

5.8 TESTE DE AVALIAÇÃO DA FORÇA BIOADESIVA

A força de bioadesão foi avaliada pela medida da força necessária para destacar as amostras mantidas em contato com a pele utilizando o analisador de textura TAXTplus.

O isolamento da pele foi realizado a partir de orelhas suínas provenientes de abatedouro. Primeiramente foi aparado os pelos da orelha, em seguida foi dessecada

cuidadosamente com bisturi retirando-a inteira inclusive com a hipoderme sem falhas ou furos. Até o dia da análise, foi armazenada em congelador para manter sua integridade (a pele não deve ser armazenada mais do que 3 meses de congelamento).

As amostras são dispostas logo abaixo da prova analítica contendo a pele fixada com um anel de borracha. Utiliza-se de 4-6g de amostra em um recipiente raso, onde a prova analítica fica cerca de 5 cm acima da superfície da amostra. A pele é introduzida na amostra em 1 mm e mantida por tempo de 5 segundos. Após esta etapa, a prova é retirada da amostra numa velocidade de 5 mm/s até total separação das duas superfícies. O software do equipamento Texture Exponent Lite registra a força necessária para a remoção, gerando um gráfico de força versus tempo, com o qual se calcula a área de bioadesão. As amostras foram termostatizadas em banho-maria à temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Para a análise estatística, os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis empregando-se o software R versão 4.0.2 usando o pacote Agricolae (DE MENDIBURU, 2017).

5.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METOTREXATO NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO MTX

Para quantificação do MTX no meio receptor, foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE, segundo normas estabelecidas pela RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. As condições cromatográficas e parâmetros validados estão resumidos a seguir:

O sistema de CLAE marca Shimadzu utilizado está disponível no Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos da UNIFAL/MG (LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A, módulo de comunicação CBM-20A, autoamostrador SIL-20AHT, Shimadzu)

O método analítico para dosagem do MTX foi realizado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna cromatográfica LiChrosphere 100 RP-18 (150x4,6d.i.) com partículas de $5\mu\text{m}$. A fase móvel foi preparada a partir de água MiliQ acidificada com 0,2% de ácido fórmico 88% e pH 3,5 ajustado com NaOH, e metanol (70:30v/v). A vazão de fase móvel foi de 1,0 mL/min., o volume de injeção de 50 μL e a detecção UV a 306 nm.

5.9.1 Curva de Calibração

As soluções de trabalho foram preparadas em solução tampão fosfato 0,2 mol/L, pH 7,4, na faixa de concentrações de 0,5 a 35 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e foram determinados o coeficiente de correlação (r) e a equação de reta cujo coeficiente angular (inclinação) e b representa o coeficiente linear (intercepto).

A seletividade foi realizada pela comparação de cromatogramas de solução padrão de MTX 35µg/mL com o meio receptor sem o fármaco.

5.9.1.1 Precisão

A precisão foi expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (DPR), apresentado na equação 1. A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula:

$$DPR = (DP/CMD) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

DP é o desvio padrão

CMD é a concentração média determinada (ANVISA, 2017).

A exatidão do método analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em relação ao real e foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme Equação 2, apresentada a seguir:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Equação 2

5.9.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise de amostras contendo concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco em estudo, até a menor quantidade que pode ser detectada. Esta estimativa foi feita através da Equação 3.

$$LD = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{IC}$$

IC

Equação 3

Em que:

IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

I - a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

II - a partir do desvio padrão residual da linha de regressão;

III - a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (ANVISA, 2017).

O limite de quantificação foi determinado experimentalmente por meio da análise de amostras contendo concentrações decrescentes do fármaco em estudo, até a menor quantidade que pode ser detectada com precisão e exatidão aceitáveis, expresso pela equação 4.

$$LQ = 10 \cdot \frac{\sigma}{IC}$$

IC

Equação 4

Em que:

IC é a inclinação da curva de calibração,

σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

I - a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

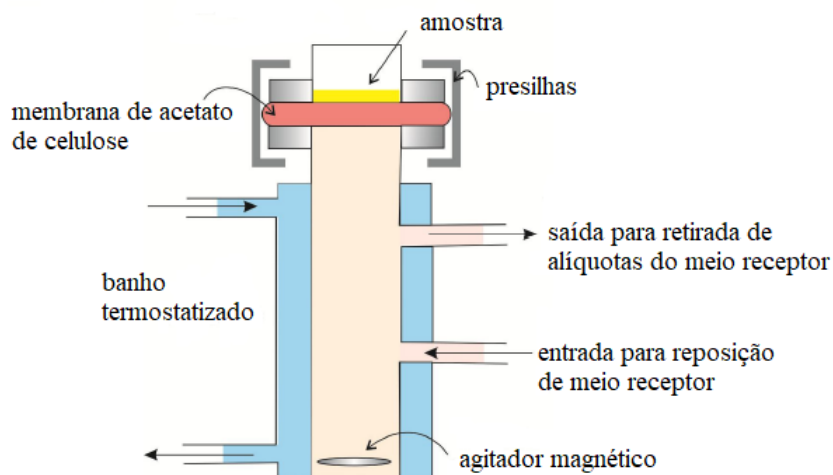
II - a partir do desvio padrão residual da linha de regressão;

III - a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (ANVISA, 2017).

5.10 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A liberação do MTX a partir das formulações escolhidas foi avaliada utilizando-se 6 células de difusão tipo Franz de volume de 7 mL (Microette Plus, Hanson Research Corporation). A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana semipermeável de acetato de celulose de 14 kDa SpectraPor[®]. O compartimento receptor foi preenchido com solução receptora composta por tampão fosfato monobásico 0,01 M pH 7,4 (ZUBEN, 2012). As formulações foram previamente pesadas em papel manteiga e transferidas com auxílio de espátula sobre a membrana disposta na célula de difusão (aproximadamente 300 mg e área de exposição de 1,77cm²) (FIGURA 12).

Figura 12 - Representação esquemática da célula de difusão utilizada para o teste de liberação *in vitro*



Fonte: Adaptado de CARVALHO (2012).

Os experimentos foram conduzidos a 37°C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm, por meio de placa magnética agitadora, onde as células ficaram dispostas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 24 e 36 horas, filtradas em membrana 0,45 µm (Milex Milipore[®]) e analisadas por CLAE conforme o método analítico validado no item 4.9. As alíquotas da coleta e os volumes desprezados foram repostos automaticamente com o objetivo de manter a condição “*sink*” do sistema e os valores utilizados nos cálculos da quantidade real permeada por tempo em função da área de exposição. A Equação 5 (USP, 2010), demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

$$Q_{\text{real, t}} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

$Q_{\text{real, t}}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza),

Segundo Costa e Lobo (2001), é possível selecionar o melhor modelo matemático efetuando-se regressão não linear e os dados são analisados avaliando os parâmetros de R^2 ajustado.

A Equação 6 abaixo do modelo Weibull exprime a fração cumulativa do fármaco em solução em função do tempo t :

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right]$$

Equação 6

Onde:

t é o tempo

T_i = representa o intervalo de tempo antes do início do processo de liberação (na maioria das vezes é zero),

b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como sendo exponencial

a é o tempo de escala do processo

5.11 ENSAIO *IN VIVO*

No presente trabalho, foi estudado o comportamento das formulações selecionadas pelo teste *in vivo* na pele psoriática (indução da psoríase por IMQ). Após o experimento, a análise macroscópica da pele bem como os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e imunoenzimáticos foram avaliados.

5.11.1 Animais e ética

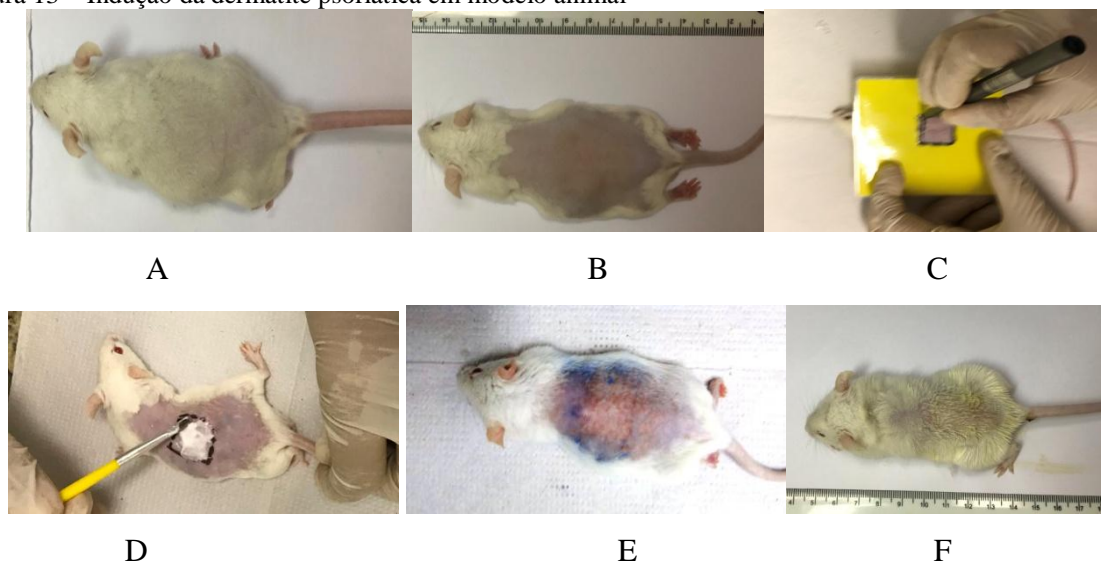
Quarenta e dois camundongos suíços machos com 8 semanas de vida foram utilizados. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, alocados em caixas individuais e mantidos em biotério de experimentação com ambiente com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (60-70%) e luminosidade controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas). Água e ração foram fornecidos à vontade. O protocolo experimental teste foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA/UNIFAL/MG, protocolo 17/2018).

5.11.2 Modelo de psoríase e grupos experimentais

Os seis grupos com sete animais foram submetidos ao mesmo procedimento inicial de indução da dermatite psoriática por meio da administração tópica de creme dermatológico contendo 5% de IMQ, de acordo com metodologia descrita por Meng et al. (2017). Brevemente, a região dorsolateral dos animais foi tricotomizada com auxílio de barbeador elétrico. Em seguida, os pelos remanescentes foram removidos por meio da aplicação de creme depilatório (Veet, Reckitt, Benckiser, Reino Unido) durante 6 minutos, seguido pela remoção dos resíduos de creme com solução de NaCl à 0,9%. A dermatite foi induzida pela administração tópica de 62,5 mg do creme IMQ (Modik, Germed, Hortolândia, SP, Brasil) em uma área demarcada de 1 cm^2 no dorso dos animais. O IMQ foi administrado diariamente durante 10 dias com a utilização de espátula de aço inoxidável e pincel. Animais submetidos à tricotomia e não tratados com IMQ foram usados como controle negativo da dermatite (FIGURA 13).

As lesões dos animais foram analisados por meio do método PASI adaptado, em seguida os animais foram eutanasiados com anestésico Ketamina[®] seguido de deslocamento cervical – método físico. Foi retirado fragmentos da pele do dorso dos camundongos para análises posteriores.

Figura 13 – Indução da dermatite psoriática em modelo animal



Fonte: Do autor

Legenda: A: camundongo com pelo raspado com máquina aparadora de pelos; B: aplicação do creme depilatório para retirada total de pelos; C: Delimitação da área de aplicação; D: Aplicação de creme indutor de dermatite psoriática; E: Dorso do camundongo com dermatite psoriática; F: camundongo no final do experimento.

Após o período de indução, os animais foram tratados topicamente com 1g das formulações de MTX, na concentração de 10mg de MTX / mL. Animais controle positivo do tratamento foram receberam 1 g de pomada contendo 1 mg do antiinflamatório esteroideal dexametasona (Germed, Hortolândia, SP, Brasil). Todos os tratamentos foram administrados diariamente, durante 5 dias consecutivos e no mesmo período da manhã (7:00h-9:00h). Foram utilizados 6 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo, o qual foi tratado como segue: **Grupo CN** (controle negativo da dermatite), sem dermatite e sem tratamento; **Grupo CD** (controle positivo da dermatite), IMQ; **Grupo CT** (controle positivo do tratamento), IMQ + dexametasona creme; **Grupo L1**, IMQ + fórmula L1-MTX; **Grupo H2**, IMQ + fórmula H2-MTX; **Grupo HCA**, IMQ + fórmula HCA-MTX. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia intraperitoneal com 100 mg/kg de Quetamina e 50 mg/kg de Xilasina. Dois fragmentos de 5mm x 5 mm (comprimento x largura) da pele dorsal foram coletados na área tratada.

5.11.3 Análise Macroscópica da Face Dérmica da Pele

A primeira análise a ser feita ao retirar o fragmento da pele psoriática do camundongo é a análise macroscópica da face dérmica da pele. O fragmento retirado é colocado em uma

superfície lisa e clara, com a pele externa virada para baixo. São tiradas duas fotos de cada fragmento para verificação das veias na face dérmica interna. É avaliado a congestão vascular, neovascularização, tamanho de vasos, e os sinais da inflamação (rubor, calor, edema).

5.11.4 Análise bioquímica de ciclooxigenase e prostaglandina

A atividade enzimática de em ciclooxigenase 2 (COX-2) na pele foi avaliada usando um kit bioquímico e as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Fragmento da pele foi homogeneizado em tampão de lise e centrifugado à $10.000 \times g$, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi coletado e usado para mensurar a atividade de COX-2. O ensaio foi baseado no componente peroxidase dessa enzima, no qual a atividade peroxidase foi medida espectrofotometricamente (Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, UK), monitorando a produção de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina oxidada à 590 nm. A atividade de COX-2 foi distinguida usando o inibidor enzimático DuP-697. A sensibilidade do ensaio de COX variou entre 13 a 63 nmol/min/mL.

Os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) na pele foram quantificados a partir de ensaio imunoenzimático tipo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando kits comerciais e instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Resumidamente, 10 μl de sobrenadante do homogeneizado foram adicionados a microplacas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpos específicos contra PGE2. Os níveis de prostaglandina foram determinados a 412 nm por espectrofotometria (ELx50, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). A sensibilidade do ensaio variou de 7,8 a 1000 pg / mL (PGE2). Os resultados foram normalizados de acordo com a concentração de proteínas no sobrenadante, conforme previamente descrito (SANTOS et al., 2015).

5.11.5 Análise bioquímica de N-acetilglucosaminidase e mieloperoxidase

Para analisar a atividade das enzimas N-acetilglucosaminidase e mieloperoxidase, amostras de pele foram homogeneizadas na presença de um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e centrifugadas à $3000 \times g$ por 15 min. O acúmulo de

macrófagos na pele foi estimado em função da atividade da enzima lisossômica N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), que é intensamente produzida a partir da ativação de monócitos/macrófagos (GUEDES-DA-SILVA *et al.*, 2015). A atividade da N-acetil- β -D-glucosaminidase foi determinada no homogeneizado de pele usando um kit colorimétrico bioquímico comercial e as instruções do fabricante (Abcam, Cambridge, Reino Unido). O ensaio de NAG utiliza um derivado sintético do p-nitrofenol (R-pNP) como substrato enzimático cuja reação libera o pNP, que é medido por espectrofotometria (Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, UK) à 400 nm (MENDONÇA *et al.*, 2020).

O recrutamento e ativação de neutrófilos na pele foi estimado a partir da atividade da enzima mieloperoxidase, conforme metodologia previamente descrito (GUEDES-DA-SILVA *et al.*, 2015). Após a centrifugação da amostra, o pelet foi coletado, homogeneizado em tampão pH 4,7 (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂-EDTA 0,015 M) e centrifugado por 10 minutos à 12.000 \times g (4° C). O pelet foi suspenso em tampão fosfato de sódio à 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio. A atividade da mieloperoxidase foi determinada por espectrofotometria (Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, UK) medindo a variação da absorvância à 450 nm, usando 0,3 mM de H₂O₂ à preparada em tampão fosfato de sódio (pH 6,0) e 1,6 mM de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina dissolvida em dimetilsulfóxido (MENDONÇA *et al.*, 2020).

5.11.6 Análise de citocinas

Os níveis de citocinas na pele foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático tipo ELISA, utilizando kits comerciais (USCN Life Science Inc., Wuhan, China). Foi utilizado o sobrenadante da pele processada no ensaio de NAG e MPO. Brevemente, placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas foram sensibilizadas com anticorpos de captura para as interleucinas 1 (IL-1) e 10 (IL-10), interferon gama (INF- γ), e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por 16 horas a 4°C. Em seguida, os poços foram bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente e 1% albumina bovina sérica preparada em tampão fosfato de sódio (PBS). Após lavagem com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T), 50 μ l do homogeneizado foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 4°C. Após lavagem com PBS-T, os poços foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora com 50 μ l dos respectivos anticorpos de detecção biotinilados diluídos. Mediante lavagem com PBS-T, 50

μL de avidina conjugada à peroxidase foi adicionada a cada poço e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após lavagem com PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50 μL de tampão de revelação (0,5 mg/mL de Ortofenilenodiamino (OPD), diluído em tampão citrato, (pH 5,0 contendo 0,05% de H_2O_2). A reação foi interrompida com 50 μL de ácido sulfúrico 4N após 15 minutos. A leitura das absorvâncias foi medida à 492 nm em leitor de ELISA (ELx50, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). A quantificação das citocinas foi determinada pela obtenção da curva padrão, utilizando citocinas recombinantes com concentrações conhecidas (RODRIGUES *et al.*, 2017).

5.11.7 Processamento histológico da pele

O fragmento de pele utilizado na análise histopatológica foi fixado em formol tamponado (pH 7,2) à 10% durante 24h, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina histológica (NOVAES *et al.*, 2016)). Para cada fragmento de pele, foram obtidos 4 cortes semi-seriados com 5 μm de espessura, os quais foram coletados em intervalos de 100 μm para evitar analisar a mesma área histológica. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica geral (GONÇALVES *et al.*, 2013, 2014). Os cortes foram montados sobre lâmina histológica e visualizados em microscópio de campo claro com lente objetiva de 40x (AxioScope A1, Carl Zeiss, Alemanha). Imagens histológicas digitais foram obtidas utilizando-se câmera fotográfica acoplada ao microscópio (AxioCam, Carl Zeiss, Germany). Para cada animal, foram obtidas 48 imagens (24 da epiderme e 24 da derme) histológicas aleatórias não coincidentes, as quais foram submetidas à análise histopatológica e estereológica.

5.11.8 Análise histopatológica da pele

A análise histopatológica da pele foi realizada a partir das mesmas imagens histológicas coradas com H&E (DA SILVA *et al.*, 2018). Foi avaliada a distribuição macroestrutural da rede de vasos sanguíneos dérmicos como evidência de congestão vascular, a distribuição da queratina/hiperqueratose, e o infiltrado inflamatório na epiderme. Foi

adotado sistema de pontuação histopatológica estabelecido por Kim *et al.* (2015), o qual foi utilizado para classificar a gravidade dos achados/alterações morfológicas em: 0= nenhum (normal), 1= leve, 2= moderado; 3= marcante, e 4= muito marcante (severa). Como a queratina também é encontrada na pele normal/saudável, o escore histopatológico foi ajustado para refletir a distribuição da queratina como segue: 1= normal, 2= hiperqueratose leve, 3= hiperqueratose moderada, 3= hiperqueratose marcante; e 4= hiperqueratose severa. O método de diagrama de campo hexagonal foi usado para representar os resultados histopatológicos (FELIZARDO *et al.*, 2018) de congestão vascular. A pele dos animais que não foram submetidos à indução de dermatite por IMQ e que não receberam nenhum tratamento com as formulações testadas foi utilizada como padrão de normalidade para a caracterização do escore histopatológico.

5.11.9 Análise histomorfométrica da pele

A espessura da epiderme e a área de superfície de contato entre derme e epiderme foram diretamente mensurados por meio de função de linear e de contorno do programa de análise de imagens Image Pro-plus 4.5 (Media Cybernetcs, Silver Spring, USA). A celularidade/infiltrado inflamatório na derme ([cel]) foi avaliado por meio do cálculo da densidade de número de células (Q_A) por unidade de área histológica. Esse parâmetro foi avaliado pelo método estereológico (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995) por meio da relação $Q_A = \Sigma[\text{cel}] / A_t$; onde $\Sigma[\text{cel}]$ corresponde ao número de células dentro da área de teste (A_t) aplicada sobre a derme. Para a análise de Q_A , foi usada uma área de teste (A_t) com $1.38 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ao nível do tecido. A análise estereológica foi realizada com o auxílio do programa de análise de imagens Image Pro-plus 4.5 (Media Cybernetcs, Silver Spring, USA) (GONÇALVES *et al.*, 2013; 2016).

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média (DPM). A

análise da distribuição dos dados foi realizada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram avaliados por análise de variância unifatorial (ANOVA one-way) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. As variáveis com distribuição não paramétrica foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Resultados com valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MTX POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX

Validou-se uma metodologia analítica por espectrometria UV a fim de padronizar um método de quantificação do MTX. Uma metodologia é considerada validada quando os parâmetros de linearidade, repetibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação estão dentro das especificações exigidas (BRASIL, 2017).

Após as leituras no espectrofotômetro das amostras de MTX diluídas em tampão fosfato e submetidas a diferentes pHs para avaliação da solubilidade, obtiveram-se as respectivas absorbâncias, expostas na Tabela 4.

Tabela 4 - Absorbâncias de soluções-padrão de MTX a 0,5 – 20 µg/mL em metanol a 306 nm.

Concentração(µg/ml)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
2,5	0,209	0,003	1,43
5	0,415	0,004	1,0
7,5	0,632	0,004	0,6
10	0,810	0,024	3,0
15	1,250	0,013	1,1
20	1,663	0,014	0,8

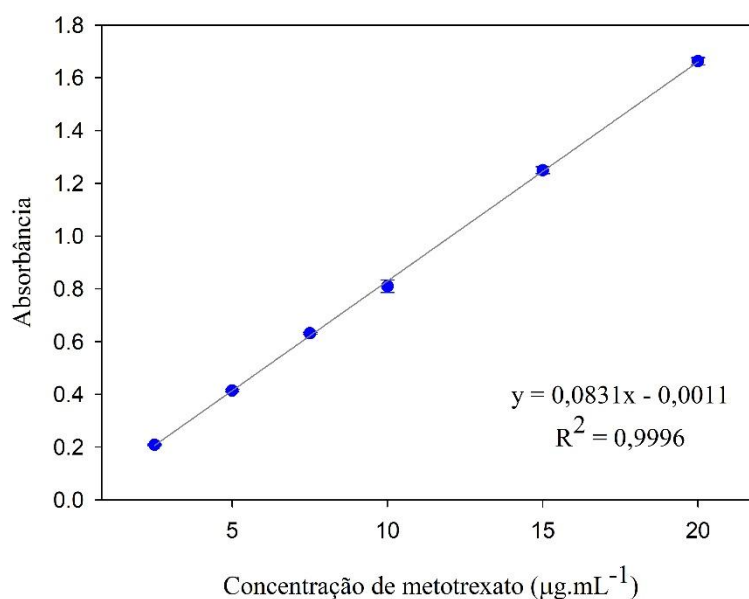
Fonte: Da autora

Com base na média dos valores das absorbâncias encontradas para cada nível de concentração, foi obtido o cálculo da regressão linear da curva analítica, obtendo-se a inclinação ($0,0831 \pm 0,005$), y-intercepto ($0,0011 \pm 0,0009$) e coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9996 (EQUAÇÃO 7), observando-se linearidade dos resultados. Então, a curva obtida foi: (FIGURA 14).

$$y = 0,0831x + 0,0011$$

Equação 7

Figura 14 - Representação gráfica da curva de calibração de soluções padrão contendo MTX a 0,5- 20 µg/mL a 306 nm por espectrofotometria UV.



Fonte: Da autora

6.1.1 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método analítico foram determinadas segundo ANVISA (2017), nas concentrações de 1, 5 e 20 µg/mL, e os resultados dos cálculos de precisão (CVs) e exatidão (R%) estão contidos na Tabela 5. A faixa de trabalho ficou compreendida entre 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento), com valores de CVs inferiores a 5%.

Eles indicam que o método é preciso, pois os valores de CVs são inferiores a 5%, e apresentam exatidão, pois os limites de recuperação não foram inferiores a 80% e nem superiores a 120% (ANVISA, 2003).

Tabela 5 - Precisão e exatidão do método analítico para quantificação do MTX nas formulações.

Concentração (µg/ml)	Média M	Desvio Padrão DP	Precisão CV	Exatidão %
1	0,069	0,001	1,449	91,7
5	0,357	0,004	1,221	100,6
20	1,395	0,016	1,143	99,2

Fonte: Da autora

A sensibilidade da metodologia analítica foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) conforme as equações 3 e 4 respectivamente. A menor concentração detectada (LD) pelo método analítico foi 0,0367 µg/mL, enquanto que o LQ calculado foi 1,1118 µg/mL.

Para verificar se o método é linear o cálculo de regressão linear com base no resultado do teste de Cochran* (C) deve ser calculado utilizando a fórmula da Equação 8 abaixo:

$$C = \frac{\text{maior variância}^2}{\sum \text{variâncias}^2} \quad \text{Equação 8}$$

*se o valor encontrado for superior ou igual ao $C_{\text{crítico}}$, a distribuição é heterocedástica e requer regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados.

Após o cálculo, foi possível avaliar que o método encontrado foi de distribuição homocedástica após verificar que o $C = 0,5858$ encontrado e analisado juntamente com o $C_{\text{crítico}} = 0,616$ na tabela da Consulta Pública nº129 de 12 de fevereiro de 2016 foi inferior confirmando que o método é linear, pois independente da concentração do MTX há igualdade (homogeneidade) entre as variâncias.

6.2 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO MTX EM DIFERENTES pHs

O MTX foi dissolvido em soluções de diferentes pHs (3,0; 4,5 e 7,0) para avaliação da solubilidade, foram encontradas as concentrações expostas na TABELA 6. Esta análise mostra que, em pH mais baixo a solubilidade é mais restrita.

Tabela 6 - Concentração real de MTX (mg/mL) em diferentes pHs para avaliação da solubilidade

	Sol.pH=3,0	Sol.pH=4,5	Sol.pH=7,0
C real (mg/mL)	0,116	0,007	2,008
Desvio padrão	0,008	0,009	0,005

Fonte: Da autora

6.3 PREPARAÇÃO E INCORPORAÇÃO DO MTX NOS HIDROGÉIS

O MTX possui diferentes formas ionizáveis, como previamente apresentado na Figura 3. Tendo isso em vista, foi obtido hidrogéis em diferentes pHs cujas diferentes formas iônicas prevaleçam. A obtenção de formulações com as diferentes formas iônicas pode permitir a comparação se este fator é crítico na penetração do MTX na pele.

Foram selecionados polímeros cuja solubilidade coincida com cada faixa de pH destas formas ionizáveis do MTX. Para a forma catiônica em $\text{pH} < 3,36$, foi selecionado hidrogéis a base de quitosana (HQS), polímero catiônico cuja dispersão é realizada em soluções ácidas. Para a forma zwitteriônica em pH entre 3,36 e 4,7, foi selecionado um polímero aniônico HHPMC e pH ajustado para 4,5. Forma aniônica em $\text{pH} > 5,71$, foi selecionado o carbômero alquilado (HCA), polímero aniônico cuja solubilidade é obtida em pH neutro.

Os hidrogéis sem MTX (base) apresentaram-se transparentes. Com a incorporação do MTX em HQS e HHPMC também resultou em géis transparentes e levemente amarelados (FIGURA 15). Porém, como a solubilidade foi muito baixa para os hidrogéis de HQS e HHPMC ($\geq 0,1 \text{ mg/mL}$), prosseguiu-se os estudos com o hidrogel de HCA. Portanto, a tentativa de aplicar diferentes formas iônicas no MTX para avaliar seu efeito tópico não foi possível devido à solubilidade limitada encontrada.

Figura 15 - Sequencia das fórmulas na foto: da esquerda para a direita: HQS, HHPMC. Os hidrogéis estão na concentração de 0,1mg/mL MTX.



Fonte: Da autora

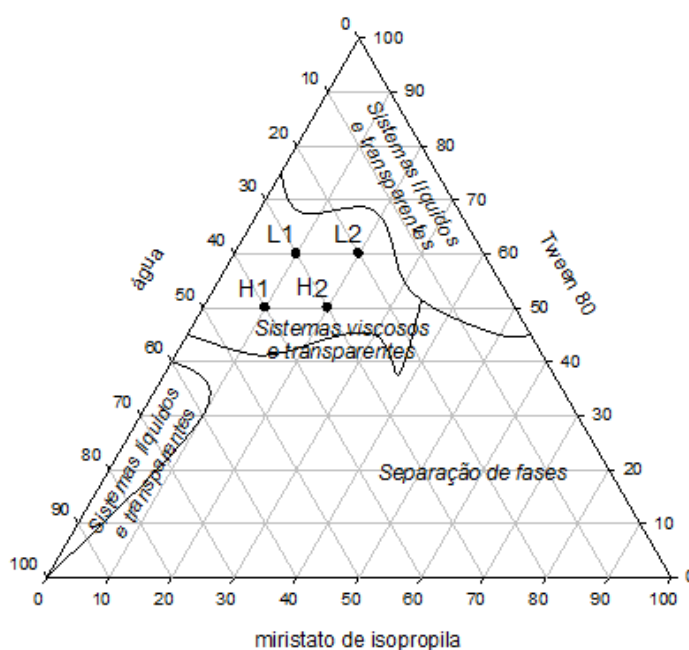
6.4 DIAGRAMA TERNÁRIO DE FASES

O diagrama de fases permite o estudo de um grande número de formulações com composições e variações das concentrações das fases, permitindo descrever em condições experimentais, a possibilidade de obter sistemas nanoestruturados como microemulsões e cristais líquidos, bem como as regiões de transição entre os sistemas obtidos (CINTRA *et al.*, 2013; ZUBEN, 2012).

Com o objetivo de encontrar formulações estáveis de fases lamelar e hexagonal, característicos de sistemas líquido-cristalinos, neste diagrama de fases foi utilizado a água (fase aquosa), miristato de isopropila (fase oleosa) e Tween 80[®] (tensoativo). Como as formulações foram desenvolvidas para uso tópico, a utilização de componentes não irritantes é de extrema importância.

A maior parte deste diagrama foi composta por combinações que separaram fases, sendo que as formulações escolhidas se mostraram visualmente estáveis durante todo o tempo de estudo (42 meses). Os pontos L1, L2, H1 e H2 foram as formulações na região onde se formaram sistemas viscosos transparentes (SVT), indicativos de formação de cristais líquidos (CLs). Estas por sua vez, foram selecionadas para caracterização físico-química (FIGURA 16)

Figura 16 - Diagrama de fases composto por Tween 80[®], miristato de isopropila (MIP) e água, L1 e L2 (fase lamelar) H1 e H2 (fase hexagonal)



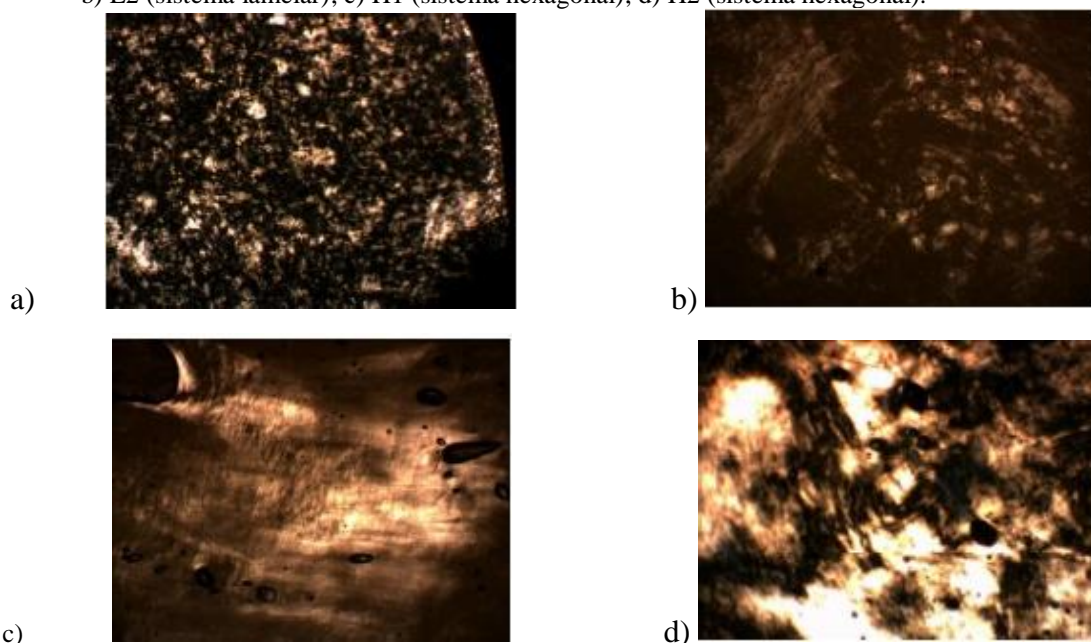
Fonte: Da autora

6.5 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP)

A microscopia de luz polarizada (MLP) se tornou uma ferramenta amplamente utilizada para identificação primária de microemulsões e de mesofases de sistemas líquido-cristalinos. A MLP apresenta a capacidade de propagar o feixe de luz em uma só direção devido à presença de um sistema polarizador de luz, acoplado ao seu condensador. As composições das formulações selecionadas para caracterização estão descritas na Tabela 7, com suas respectivas caracterizações por MPL. As imagens obtidas estão dispostas na Figura 17.

As formulações escolhidas apresentaram anisotropia, com a presença de fases líquido-cristalinas, sugerem ser 2 fórmulas de mesofase lamelar e 2 fórmulas de mesofase hexagonal pois, por evidenciar “cruzes de malta”, que são estruturas características de fase lamelar (L1 e L2). Nas formulações H1 e H2 foi verificado “estrias”, características de fase hexagonal (CARVALHO, 2012). As diferentes mesofases encontradas na faixa do diagrama estudado parecem ter correlação com a quantidade de tensoativo. A concentração maior de tensoativo (60% p/p) proporcionou a formação de fase lamelar, enquanto a diminuição para 50% p/p houve a mudança para a fase hexagonal. Pode ser sugerido que a diminuição do tensoativo aumentou a tensão interfacial entre fase aquosa e oleosa, mudando para a fase hexagonal, cuja área interfacial entre ambas as fases pode ser menor que a fase lamelar.

Figura 17 - Sequencia das fórmulas na foto (Aumento 20x): da esquerda para a direita: a) L1(sistema lamelar); b) L2 (sistema lamelar); c) H1 (sistema hexagonal); d) H2 (sistema hexagonal).



Fonte: Da autora

Tabela 7 - Porcentagem de Tween[®] 80/MIP/água e classificação das formulações L1, L2, H1 e H2.

Amostra	Fase Tensoativo % (Tween [®] 80)	Fase oleosa % (MIP)	Fase aquosa % (Água)	Classificação
L1	60	10	30	lamelar
L2	60	20	20	lamelar
H1	50	10	40	hexagonal
H2	50	20	30	hexagonal

Fonte: Da autora

6.6 INCORPORAÇÃO DO MTX NOS SISTEMAS CRISTAIS LÍQUIDOS (CLs)

O MTX foi incorporado na concentração de 2 mg/mL nos sistemas CLs (FIGURA 18) pois foi a concentração solúvel encontrada em pH 7,4 no ensaio de solubilidade.

As formulações L1, L2, H1 e H2 que apresentam pH 7,4, após a incorporação do MTX, não apresentou turbidez nos sistemas, ou seja, neste pH o fármaco está solúvel e as formulações apresentam-se límpidas.

Figura 18 - Sequencia das fórmulas na foto: da esquerda para a direita: L1, L2, H1, H2, Todas as formulações na concentração de 2mg/mL MTX.



Fonte: Da autora

6.7 ANÁLISE REOLÓGICA OSCILATÓRIA DOS CLs E HIDROGEL

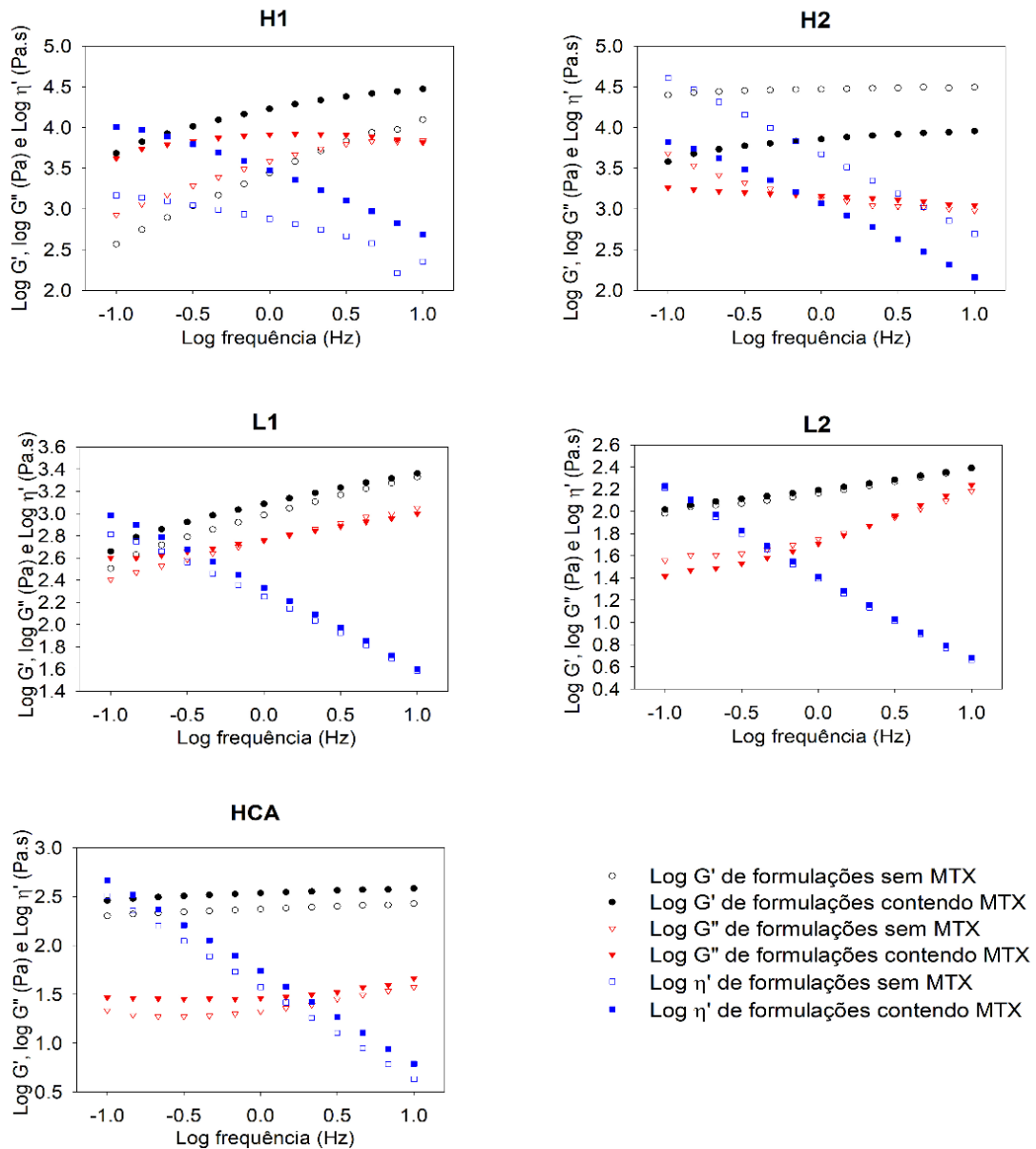
Análises reológicas compreendem o estudo do comportamento da deformação de um material quando submetido a uma dada tensão, podendo resultar em deformações do tipo

viscosa ou elástica, ou seja, conforme o tipo de tensão aplicada sobre o material, este irá apresentar comportamento de um sólido elástico ou de um líquido viscoso (SCHRAMM, 2006).

As caracterizações reológicas foram feitas nos módulos de armazenamento ou elástico (G') e módulo de perda ou viscoso (G''), em função da frequência. Quando ocorre predomínio do módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G'') compreende-se que o sistema possui uma maior estruturação, e fortes interações entre as moléculas (YARIV et al., 2010). O módulo elástico ou de armazenamento (G') é a medida elástica do material, ou seja, a capacidade que o material possui de armazenar energia. O módulo viscoso ou de perda (G'') determina a capacidade do fluido em dissipar energia em forma de calor. As amostras foram estudadas em relação ao seu comportamento viscoelástico, com objetivo de avaliar as características estruturais das formulações. Foram realizados ensaios de varredura com frequência de 0,1 a 10Hz. Uma deformação dentro da Região Viscoelástica Linear (RVL) foi definida para avaliação para as análises de varredura de frequência (mais próximo de 5Hz).

Os reogramas obtidos estão na Figura 19.

Figura 19 - Reogramas mostrando a dependência da frequência dos módulos elástico (G') (círculo preto) e viscoso (G'') (triângulo vermelho), viscosidade dinâmica (η') (quadrado azul): fases hexagonais (H1 e H2), fases lamelares (L1 e L2) e hidrogel (ACH).



Fonte: Da autora

A Tabela 8 mostra os dados de G' , G'' e viscosidade (η') numa frequência fixa (4,6 Hz) para comparação da magnitude dos valores obtidos para cada amostra. Para todas as amostras, o módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de perda (G''), sendo que a incorporação do MTX aumentou de maneira geral o G' das amostras, sugerindo que a estrutura molecular do fármaco pode estar participando da formação da rede tanto líquido-cristalina como do hidrogel. Estes resultados são característicos de um comportamento predominantemente elástico, sugerindo que os sistemas estão bem estruturados e possuem fortes interações entre as moléculas (YARIV *et al.*, 2010).

Tabela 8 - Valores do módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e viscosidade (η') na frequência de fixa de 4,6Hz.

Amostras	Sem MTX				Com MTX a 2 mg/ml			
	Frequencia (Hz)	G'	G''	η'	Frequencia (Hz)	G'	G''	η'
L1	4,6	1673,0	930,9	65,6	4,6	1905,0	842,6	71,4
L2	4,6	202,5	105,7	7,8	4,6	209,6	113,3	8,2
H1	4,6	8665,0	6753,0	376,7	4,6	26120,0	7761,0	934,2
H2	4,6	31050,0	1043,0	1065,0	4,6	8600,0	1237,0	297,9
HCA	4,6	256,9	31,0	8,9	4,6	371,3	37,1	12,8

Fonte: Da autora

No presente trabalho, foi possível verificar que as mesofases hexagonais apresentaram maior viscosidade em relação aos sistemas lamelares. Isso pode ser explicado pela diferença na estrutura de ambas as mesofases. A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando rede unidimensional, apresentando uma característica de líquido viscoso. Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos, originando estruturas bidimensionais, tendo uma aparência mais viscosa como um gel (FORMARIZ *et al.*, 2005).

O hidrogel HCA apresentou menos estruturado com relação a H1 e H2 (cristais líquidos hexagonais) e semelhante com módulo elástico com valores entre L1 e L2 (cristais líquidos lamelares).

Por análise reológica oscilatória, as formulações foram submetidas a estresse para simular condições compatíveis com a aplicação *in vivo* do produto, fornecendo informações importantes quanto à sua adequação para uso clínico (FERREIRA *et al.*, 2017). Todas as formulações apresentaram-se dependentes de frequência. Essa dependência foi observada em maior magnitude para η' , que diminuiu notavelmente com o aumento da frequência.

H1 sem MTX apresentou característica elastoviscosa abaixo de 3,16 Hz ($G'' > G'$). O comportamento das fases hexagonais foi mais modificado pelo carregamento do MTX do que as fases lamelares e hidrogel.

O aumento de G' e G'' observado para HCA foi pequeno, o que indica que, neste caso, as interações moleculares não covalentes e o emaranhamento da cadeia polimérica não são os principais responsáveis pela formação da estrutura elástica (JONES *et al.*, 2016). Embora o HCA não tenha apresentado os maiores valores absolutos de G' , a magnitude da

superioridade de G' sobre G'' foi maior para o hidrogel em todas as frequências o que indica um comportamento elástico mais acentuado para o hidrogel, que proporciona maior retenção cutânea (FERREIRA *et al.*, 2017), uma característica muito favorável para formulações tópicas.

6.8 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) DOS CLs E HIDROGEL

A análise do perfil de textura (TPA) foi originalmente proposta como um método adequado para caracterizar formas farmacêuticas semissólidas de fármacos por JONES *et al.* (1997). As propriedades de textura de uma formulação é um parâmetro importante na otimização de formulações tópicas que poderão dar indícios da aplicabilidade da formulação no local de administração influenciando no resultado da terapia (CINTRA *et al.*, 2013).

As formulações foram submetidas ao teste de TPA e os resultados estão na Tabela 9:

Tabela 9 - Resultado das análises de TPA das formulações CLs e Hidrogel não carregados.

Amostras	Adesividade	Compressibilidade	Coesividade
	(N.s) Média ± DP	(N.s) Média ± DP	Media ± DP
H1	5,796 ^a ± 0,214	7,590 ^g ± 0,127	0,798 ^h ± 0,082
H2	5,253 ^a ± 1,041	7,978 ^g ± 2,331	0,707 ^h ± 0,059
L1	2,034 ^b ± 0,315	3,666 ^f ± 1,285	0,664 ^h ± 0,170
L2	0,055 ^d ± 0,021	0,472 ^e ± 0,519	0,763 ^h ± 0,531
HCA	0,597 ^c ± 0,138	1,735 ^{ef} ± 0,379	0,805 ^h ± 0,026

Fonte: Da autora

Legenda: letras iguais correspondem igualdade estatística (P > 0,05)

A adesividade é o trabalho necessário para ultrapassar as forças de atração entre o material e a superfície da sonda; a coesão é a razão do trabalho realizado no segundo ciclo pelo trabalho realizado no primeiro ciclo; a compressibilidade ou compressão é a força máxima registrada no primeiro ciclo de penetração.

A análise estatística (TABELA 7) demonstrou que os valores encontrados são significativamente diferentes, sendo que apenas os cristais líquidos hexagonais (H1 e H2) apresentam adesão estatisticamente semelhantes. Os valores da compressão das formulações apresentaram-se com homogeneidade de variância e normalidade de resíduos, sendo possível analisar que os dois cristais líquidos lamelares (L1 e L2) apresentaram compressão

estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$), os CLs hexagonais (H1 e H2) apresentaram compressão semelhantes entre si ($P > 0,05$) e o hidrogel (HCA) apresentou compressão diferente dos CLs hexagonais (H1 e H2) e semelhantes dos CLs lamelares (valor intermediário entre L1 e L2).

A coesividade obtida para as amostras está dentre a faixa de valor 0,6 a 0,8. Quanto mais próximo o valor for de uma unidade, maior a coesão. Para valores menores que um, significa que os sistemas apresentam menor resistência à compressão quando a prova analítica penetra na amostra pela segunda vez. Isto é um indicativo de sistemas tixotrópicos, ou seja, afinam com o cisalhamento da amostra. Na análise estatística referente à coesão, é possível concluir que todas as formulações foram idênticas, apesar dos valores aparentarem ser diferentes, todas tem boa capacidade de coesão.

Avaliando os CLs, pode-se observar que os hexagonais H1 e H2 apresentaram valores de compressão e adesão semelhantes e bem maiores que as fases lamelares L1 e L2. As fases lamelares, por sua vez, tiveram diferença de valores, sendo L1 maior que L2, por esta situar-se mais próxima de uma região de separação de fases no diagrama ternário de fases. O hidrogel HCA obteve valores de compressão e adesão intermediários entre L1 e L2. Estes dados corroboram com a reologia, confirmando a estruturação dos sistemas.

6.9 ANÁLISE DO PERFIL DE BIOADESÃO DOS CLs E HIDROGEL

A bioadesão é relacionada com a fixação da formulação sobre a pele, considerando o movimento do corpo, sudorese e ações externas, que podem levar a remoção da formulação. Os resultados dos ensaios de bioadesão realizados no texturômetro estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultado das análises de bioadesão das formulações CLs e hidrogel

Amostras	Trabalho de Bioadesão (N.s)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
H1	0,063 ^{bc}	0,004	7,461
H2	0,064 ^{bc}	0,014	21,780
L1	0,078 ^{ab}	0,010	14,003
L2	0,057 ^c	0,005	8,898
HCA	0,119 ^a	0,017	14,288

Fonte: Da autora

Legenda: letras iguais correspondem igualdade estatística ($P > 0,05$)

A análise estatística mostrou que os valores de bioadesão das formulações foram significativamente diferentes. O hidrogel HCA e L1 mostraram ter maior adesão estatisticamente semelhante, seguido da bioadesão intermediária dos CLs hexagonais H1 e H2 e, por último, o que menos adere à pele foi L2.

Desta maneira, diferente dos resultados prévios de reologia e TPA, a amostra lamelar L1 apresentou maior bioadesão que as fases hexagonais. Com relação ao hidrogel HCA, este apresentou maior bioadesão do que o CLs.

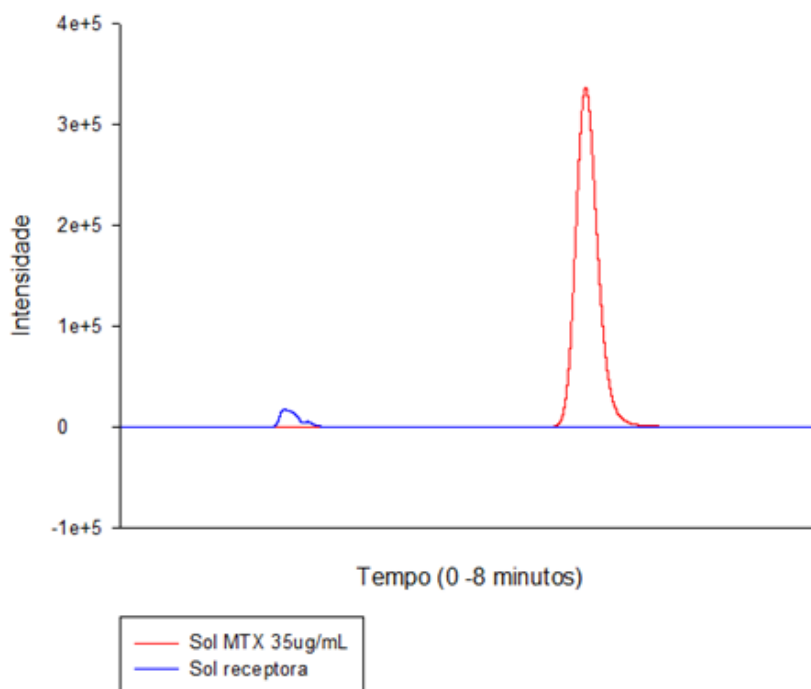
Estes resultados mostram que formulações com estrutura mais rígida como fases hexagonais não necessariamente correlacionam com melhor bioadesão.

Comparando a bioadesão, em que a análise é feita com pele suína, e a adesão no TPA, em que a análise é feita apenas com o toque da prova analítica, podemos observar que há uma diferença no comportamento dos sistemas. Portanto, estes resultados mostraram visualmente que o hidrogel possui melhor bioadesão que os CLs.

6.10 VALIDAÇÃO DO MTX POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Foram testadas diversas proporções de fase móvel de (ácido fórmico a 0,2%) e metanol para detecção do melhor tempo de retenção do MTX. A proporção escolhida foi (70:30), pois o tempo de retenção ficou entre 4 e 6 minutos (FIGURA 20).

Figura 20 – Representação gráfica do cromatograma da solução padrão de MTX e o meio receptor



Fonte: Da autora

A curva de calibração do MTX foi realizada nas concentrações de 0,5; 2,5; 5; 10; 20; 25 e 35 $\mu\text{g/mL}$. Validou-se uma metodologia analítica por CLAE a fim de padronizar um método de quantificação do MTX e após as leituras em CLAE das amostras de MTX diluídas em tampão fosfato e obtiveram-se os respectivos picos de retenção, expostos na Tabela 11.

Com base na média dos valores das áreas dos picos encontrados para cada nível de concentração, foi obtido o cálculo da regressão linear da curva analítica, obtendo-se a inclinação (224539), y-intercepto (23977) e coeficiente de correlação linear de 0,9997. Então, a curva obtida foi: $y = 224539x - 23977$.

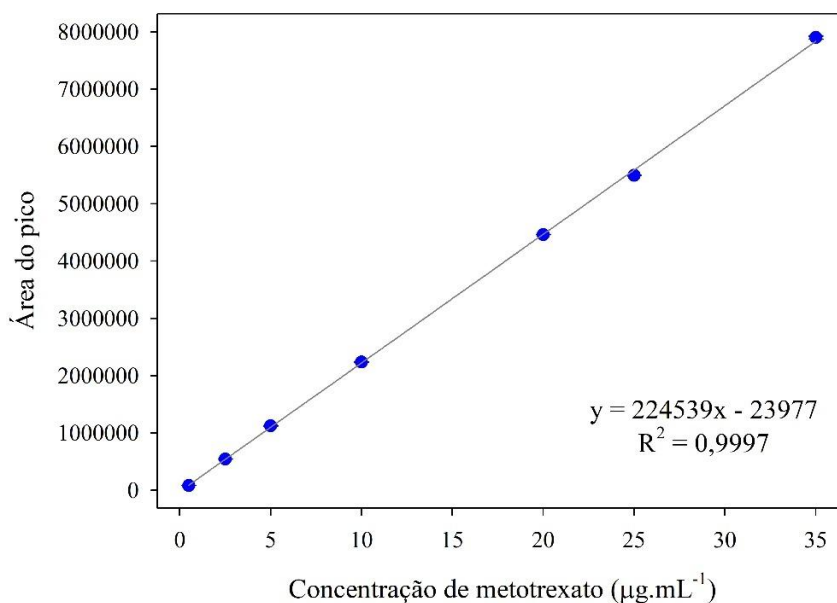
Considera-se que $0,91 < R < 0,99$ é uma correlação fortíssima, mas mesmo assim, ao aplicar os testes para avaliar a linearidade e homocedasticidade, verificou-se que a curva de calibração deveria ser ajustada (FIGURA 21).

Tabela 11 - Leitura das áreas sob a curva das soluções-padrão contendo MTX a 0,5 – 35 µg/mL a 306 nm.

Concentração (µg/ml)	u.A	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
0,5	80652	160,48	0,1989
2,5	543049	2235,83	0,4117
5	1124052	4371,78	0,3889
10	2236513	1357,25	0,0606
20	4461193	1807,95	0,0405
25	5492051	2062,73	0,0375
35	7898457	26478,91	0,3352

Fonte: Da autora

Figura 21 - Representação gráfica da curva de calibração de soluções padrão contendo MTX a 0,5-35 µg/mL a 306 nm.



Fonte: Da autora

O teste de Cochran* (C) deve ser calculado utilizando a Equação 6 (pág. 54) para comparar a variância, e, avaliar se esta aumenta à medida que aumenta a concentração, verificando assim se há homocedasticidade.

Por meio do *software* R[®] efetuou-se o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados para obtenção da equação da reta ajustada. A confiabilidade da reta obtida foi avaliada estatisticamente pela avaliação da significância do coeficiente angular (teste F), análise da soma residual dos quadrados mínimos (SSE), inspeção visual da

distribuição dos resíduos em torno do eixo x e da plotagem simultânea de y observado experimentalmente e y calculado a partir da equação da reta.

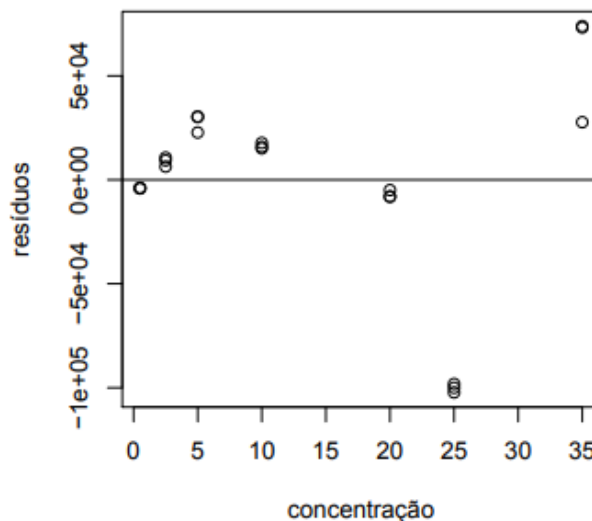
Pelo teste de Cochran, foi possível constatar que os dados encontrados foram heterocedásticos, pois o $C = 0,954$ encontrado e comparado ao $C_{\text{crítico}} = 0,561$ na tabela da Consulta Pública nº129 de 12 de fevereiro de 2016 foi superior e requer regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados.

Para corrigir a heterocedasticidade, aplica-se o Método de Mínimos Quadrados Ponderados. A Análise da soma residual dos mínimos quadrados ponderados (quanto mais próxima de zero, melhor) foi calculada pelo *software* R e os valores reais encontrados de R^2 ajustado foi 0,9998 e $r = 0,9999$, indicando uma boa correlação entre as variáveis, definindo então uma nova Equação 9:

$$y = 224797,3.x - 27738,9 \quad \text{Equação 9}$$

O teste F demonstrou que o coeficiente angular foi significativo com valor de $p < 2,2 \times 10^{-16}$. A soma residual dos mínimos quadrados ponderados (quanto mais próxima de zero, melhor), calculada pelo Programa R, foi $2,2874 \times 10^9$ e o teste de Shapiro-Wilk demonstrou que não há normalidade dos resíduos e apresentou $p < 0,05$. Abaixo Figura 22 ilustra o gráfico dos resíduos *versus* concentração indica que o problema da heterocedasticidade dos erros foi solucionado, pois os resíduos ponderados estão dispostos homogeneamente em torno de zero.

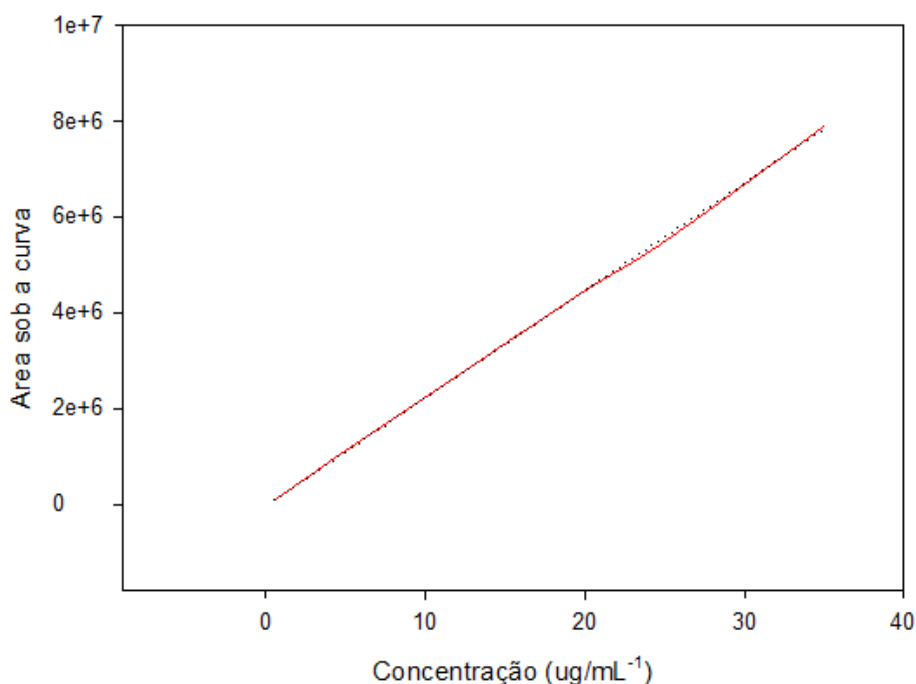
Figura 22 - Gráfico de distribuição de resíduos (em torno do eixo x) *versus* concentração



Fonte: Da autora

A plotagem simultânea dos valores experimentais e dos valores calculados a partir da equação resultante do ajuste ponderado (FIGURA 23) demonstra coincidência, indicando a adequação da regressão efetuada.

Figura 23 - Representação gráfica da curva de calibração ajustada pela soma residual dos mínimos quadrados ponderados com soluções padrão contendo MTX a 0,5-35 $\mu\text{g/mL}$ a 306 nm, evidenciando que os valores calculados a partir da equação são praticamente coincidentes com os valores experimentais.



Fonte: Da autora

6.10.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Foi calculado os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) empregando-se os valores de desvio padrão e da inclinação da curva analítica, conforme demonstrados nas equações 3 e 4, respectivamente. A menor concentração detectada (LD) pelo método analítico foi 0,047 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o LQ calculado foi 0,144 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, baseado nos resultados obtidos durante estes ensaios, conclui-se que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação e detecção do MTX.

A precisão e exatidão do método analítico foi determinada usando três réplicas de soluções padrão de MTX nas concentrações de 0,5, 10 e 35 $\mu\text{g/mL}$, e os resultados dos

cálculos de precisão (CVs) e exatidão estão contidos na Tabela 12. Os resultados foram analisados de acordo com a RDC 166/2017.

Além de linear, o método demonstrou ser exato (houve recuperação entre 96,4% e 120,7%). Encontrou-se uma precisão intradia muito favorável (TABELA 12), com DPR máximo de 0,199%. A precisão interdia variou de 2,622 a 6,646%. A legislação vigente estabelece que os limites aceitáveis para tais parâmetros devem ser justificados de acordo com o objetivo do método e sua variabilidade intrínseca, a concentração de trabalho e a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Segundo Brito *et al.* (2003) a validação é essencial para definir se métodos estudados estão adequados aos objetivos a que se destinam, com resultados confiáveis e satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises. A exatidão e a precisão do método são parâmetros sempre estudados, quando forem testes quantitativos. Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

Tabela 12 - Resultados para a determinação de exatidão e precisão intra e interdia do método de quantificação de MTX por CLAE

Ensaio	c.t.	c.e. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Precisão (%)	Exatidão (%)
	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	M	DP		
Intradia	0,5	0,466	0,001	0,199	96,4
	10,0	10,067	0,006	0,060	100,7
	35,0	35,283	0,118	0,335	100,7
Interdia	0,5	0,603	0,033	6,646	120,7
	10,0	10,620	0,562	5,348	106,3
	35,0	34,185	0,893	2,622	97,6

Fonte: Da autora

Legenda: c.t. = concentração teórica; c.e. = concentração experimental; M = média; DP = desvio padrão

O principal objetivo deste método é possibilitar a comparação entre diferentes amostras quanto à capacidade de incorporação do fármaco pelos sistemas e a seu perfil de liberação.

Considera-se que há possíveis erros humanos no preparo das amostras, e que o método está sujeito às variações do equipamento, além de oscilações de energia, temperatura entre outros.

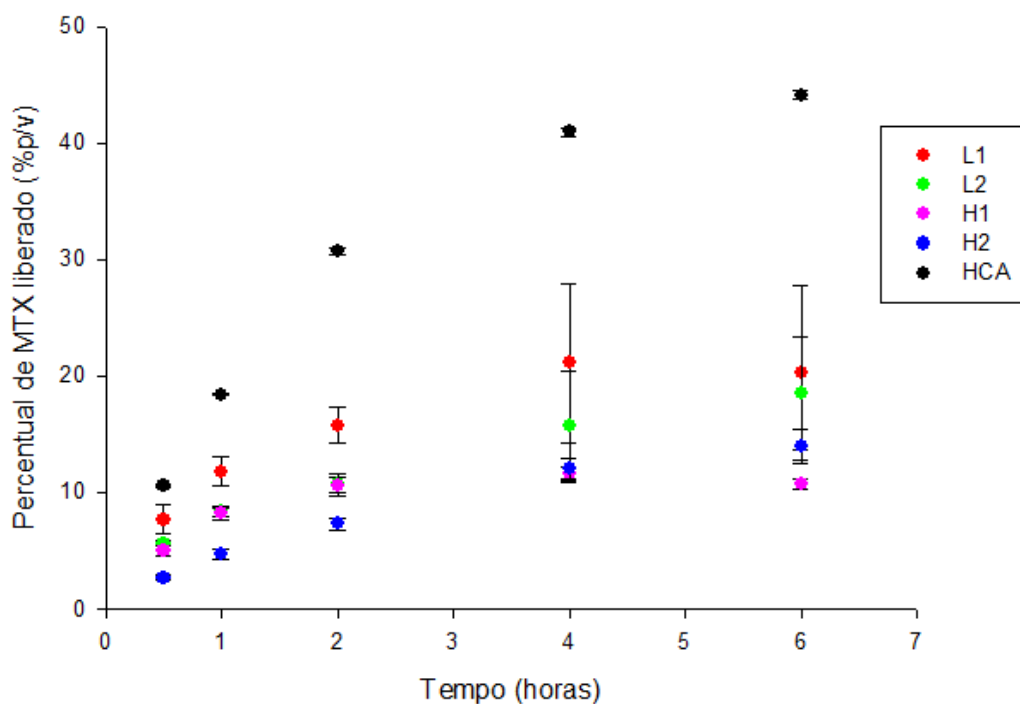
A legislação em vigor (BRASIL, 2017) não especifica o DPR máximo aceitável da concentração do analito na amostra e nem da concentração de trabalho. Na ausência de um parâmetro de comparação, optou-se por avaliar a precisão intermediária pelo teste t de student, conforme sugerido na consulta pública que precedeu a legislação vigente (ANVISA, 2016). Na concentração de 0,5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, análises efetuadas em 6 dias diferentes observou-se igualdade entre alguns dias mas diferença entre outros. Para as concentrações de 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram $p > 0,05$, ou seja, houve igualdade estatística presumindo amostras com variâncias equivalentes. A falta de reprodutibilidade perfeita não invalida completamente a aplicação do método. Como foram demonstradas linearidade, exatidão e repetibilidade perfeitamente aceitáveis, uma alternativa coerente seria quantificar as amostras a partir de uma nova curva de calibração construída para cada dia de análise.

6.11 TESTE DE LIBERAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CLs e HIDROGEL

Inicialmente foi feito o teste de liberação com formulações contendo 2 mg/mL de MTX, por ser a solubilidade do MTX em pH 7,4. Testes preliminares feitos com as formulações de MTX nesta concentração resultaram em valores abaixo do limite de quantificação. Na tentativa de supersaturar as amostras para possivelmente forçar maior liberação do fármaco, as formulações foram manipuladas com 10 mg/mL de MTX e novamente avaliadas no teste de liberação *in vitro*. Conforme Maderuelo, Zarzuelo e Lanao (2011) descrevem, em geral, a saturação do sistema com o fármaco pode resultar em maiores taxas de liberação.

Os resultados de liberação foram expressos relacionando a quantidade de massa acumulada de MTX liberada (%) em função do tempo de coleta. As formulações foram testadas em triplicata e os perfis de liberação das formulações estão demonstrados na Figura 24. Os dados foram plotados no programa Sigma[®] até 6h de ensaio, pois nos tempos subsequentes não houve detecção do fármaco.

Figura 24 - Representação gráfica da % liberação de MTX (%p/v) *versus* tempo (horas) das formulações L1, L2, H1, H2 e HCA



Fonte: Da autora

É possível identificar que as formulações hexagonais (H1 e H2) retiveram mais o MTX do que as formulações lamelares (L1 e L2), ou seja, liberaram menos fármaco/tempo devido a sua estrutura mais rígida e organizada. Portanto, a rede líquido cristalina retém mais a liberação de MTX do que uma rede polimérica gelificada. Para a análise dos perfis de liberação, foram estudados os modelos matemáticos de liberação como os de Primeira Ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull e os critérios utilizados para avaliação e comparação das formulações foram o valor de R^2 ajustado e o coeficiente b. Os valores estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Critérios para avaliação e escolha dos modelos matemáticos

Amostras	Korsmeyer-Peppas	Higuchi	1ª ordem	Weibull	Weibull
	R ² ajustado	R ² ajustado	R ² ajustado	R ² ajustado	Coefficiente b
L1	0,8992	0,5649	0,5273	0,9960	2,1109
L2	0,9949	0,9944	0,5613	1,0000	0,7993
H1	0,6799	0,1655	0,0000	0,9509	1,3083
H2	0,9843	0,9605	0,8587	0,9933	1,5178
HCA	0,9395	0,9545	0,7410	0,9999	1,0455

Fonte: Da autora

Após aplicação dos modelos matemáticos, todas as formulações apresentaram valores elevados de R² ajustado, sendo o modelo Weibull o que melhor se ajustou ao perfil de liberação das formulações L1, L2, H1, H2 e HCA. Este modelo pode ser aplicado com sucesso a quase todos os tipos de curvas de dissolução e é comumente usada em estudos de novas formas farmacêuticas.

No modelo de Weibull, é possível obter o coeficiente b, que caracteriza a curva como exponencial. A curva ($b = 1$ – cinética de 1ª ordem) onde o gradiente de concentração no meio de dissolução aumenta a taxa; sigmóide, em forma de S, com curvatura para cima seguida de um ponto de virada; ($b > 1$ – cinética rápida) ou parabólica, com uma inclinação inicial mais alta, onde a função Weibull indica que o processo de liberação é um mecanismo complexo e ($b < 1$ – cinética lenta) que indica um mecanismo combinado que é frequentemente encontrado em estudos de liberação (COSTA e LOBO, 2001; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

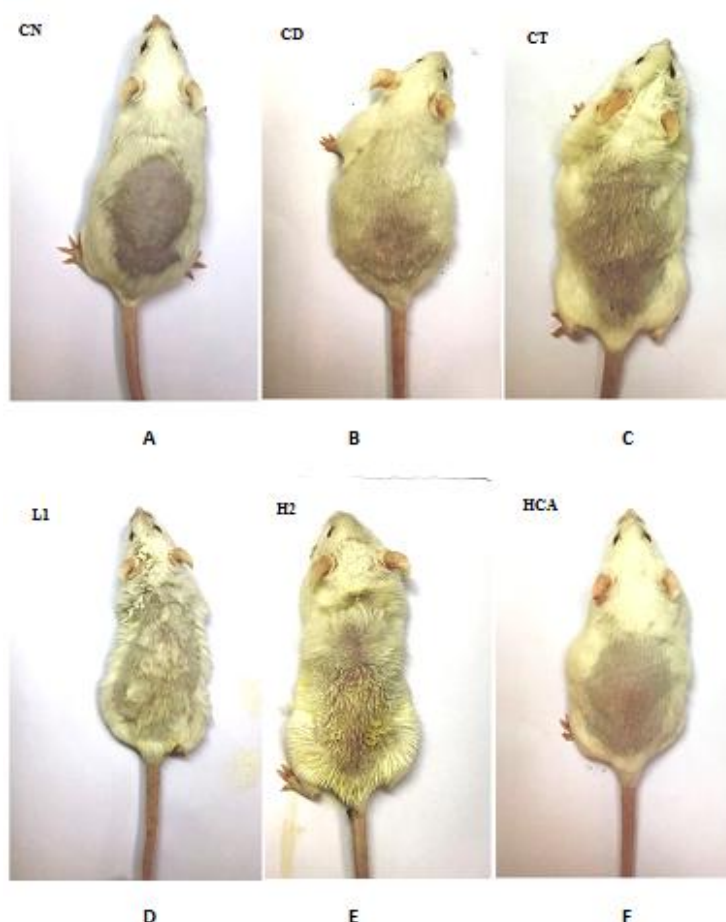
A Tabela 16 apresenta os valores do coeficiente b obtidos pelo modelo de Weibull. Independentemente da concentração dos componentes dos CLs ou do polímero utilizado no hidrogel, todas as formulações exibiram uma cinética rápida e mecanismo de liberação complexo ($b > 1$), exceto em L2 que apresentou coeficiente $b < 1$, mostrando ter um mecanismo combinado com cinética lenta. É possível comprovar este perfil ao analisar a Figura 21.

As formulações escolhidas para os testes *in vivo* foram os CLs L1 (lamelar) e H2 (hexagonal) e HCA por apresentarem menor tempo de liberação.

6.12 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Após a indução da dermatite psoriática por IMQ, os resultados das lesões formadas foram acompanhadas pelo índice de PASI dos camundongos ao longo do experimento demonstrou um aumento progressivo da dermatite psoriática dia-a-dia confirmando que o IMQ é capaz de promover a indução. Também foi analisado o índice PASI adaptado no início e final do tratamento subsequente para avaliar a melhora visual do eritema, descamação e área envolvida pela dermatite psoriática da pele (FIGURA 25) e os resultados foram posteriormente confirmados com os testes histológicos por meio de fotomicrografias, bioquímicos, e imunoenzimáticos de citocinas inflamatórias.

Figura 25 - Camundongos suíços após 5 dias de tratamento tópico de MTX: A - **Grupo CN** (controle negativo da dermatite), sem dermatite e sem tratamento; B - **Grupo CD** (controle positivo da dermatite), IMQ; C-: **Grupo CT** (controle positivo do tratamento), IMQ + dexametasona creme; D - **Grupo L1**, IMQ + fórmula L1-MTX; E - **Grupo H2**, IMQ + fórmula H2-MTX; F - **Grupo HCA**, IMQ + fórmula HCA-MTX.



A Tabela 14 mostra a evolução visual da dermatite psoriática após o tratamento das formulações, dando informações que posteriormente serão confirmadas pelas análises histológicas, bioquímicas e imunohistológicas. As formulações que apresentaram melhora do eritema foram os grupos CT, L1 e HCA. Com relação à descamação, a dermatite psoriática foram os grupos CT e HCA. Com relação à área afetada, a melhora foi nas formulações CD, CT, L1 e HCA.

Tabela 14 - Índice de PASI antes e depois do tratamento da dermatite psoriática

Grupos	1º dia tratamento PASI (%)			5º dia do tratamento PASI (%)		
	Eritema	Descamação	Area envolvida (1cm ²)	Eritema	Descamação	Area envolvida (1cm ²)
CN	(0) 100%	(0) 100%	0%	(0) 100%	(0) 100%	0%
CD	(1) 66,66% (2) 33,33%	(0) 100%	+100%	(0) 33,33% (1) 49,99% (2) 16,66%	(0) 100%	80 -100%
CT	(1) 33,33% (2) 33,33% (3) 33,33%	(0) 83,33% (1) 16,66%	+100%	(1) 100%	(0) 100%	80-100%
L1	(2) 71,42% (3) 28,57%	(0) 28,57% (1) 71,42%	+100%	(0) 20% (1) 40% (2) 40%	(0) 80% (1) 20%	90-100%
H2	(1) 57,14% (2) 42,28%	(0) 57,15% (1) 42,85%	+100%	(1) 42,85% (2) 42,85% (3) 14,29%	(0) 42,85% (1) 57,15%	100%
HCA	(1) 42,85% (2) 57,14%	(1) 42,85% (2) 57,14%	+100%	(1) 57,15% (2) 42,85%	(0) 100%	80-100%

Fonte: Da autora

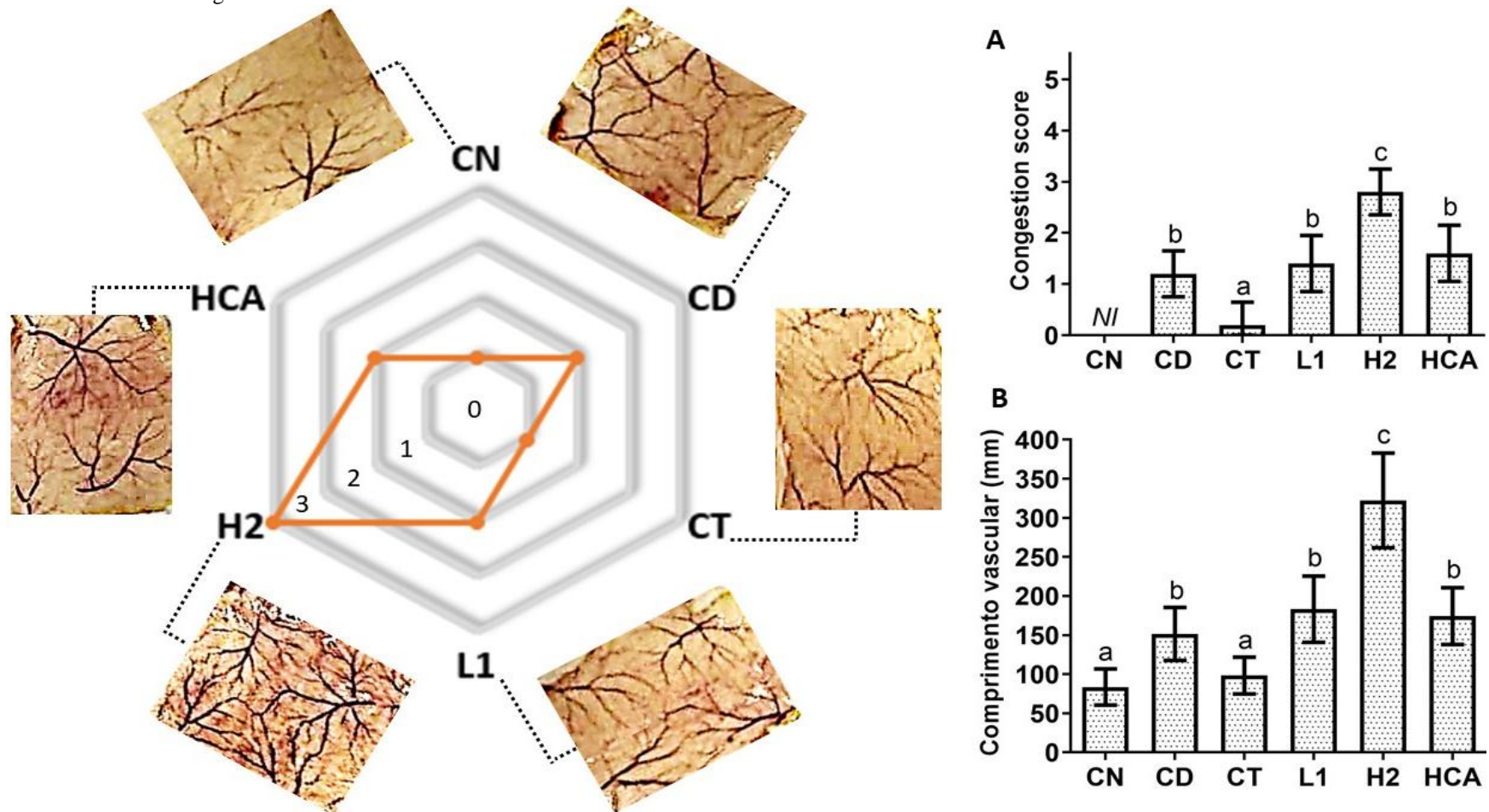
Legenda:(0) – sem dermatite psoriática; (1) – dermatite suave; (2) – dermatite moderada; (3) – dermatite severa; (4) – dermatite muito severa. *A porcentagem da tabela representa a quantidade de animais por grupo que foram classificados no índice PASI

A análise macroscópica da face dérmica da pele (FIGURA 26) indicou distribuição mais evidente da rede macrovascular nos grupos CD e L1 e HCA comparado com os grupos CN e CT. A pele dos animais do grupo H2 apresentou maior congestão vascular com ramificação mais proeminente em relação aos demais grupos. Esses achados foram confirmados pelo escore histopatológico de congestão vascular. Além disso, a análise morfométrica indicou que a pele dos animais dos grupos CD e L1 e HCA apresentou notória

congestão vascular, representada pelo maior comprimento da rede macrovascular comparado aos grupos CN e CT ($P < 0,05$). Esse parâmetro foi mais elevado no grupo H2 em relação aos demais grupos ($P < 0,05$).

É possível perceber um processo de neovascularização no qual novas estruturas vasculares se formam e, especificamente neste caso pode ser chamada de angiogênese. Esta congestão visível se refere ao aumento de volume de sangue em um tecido deixando os vasos sanguíneos (capilares) repletos e dilatados e a hiperemia deixa órgão avermelhado vivo, tumefeito, quente, confirmando um processo inflamatório instalado. A formulação H2 foi a que mais apresentou os eventos citados acima.

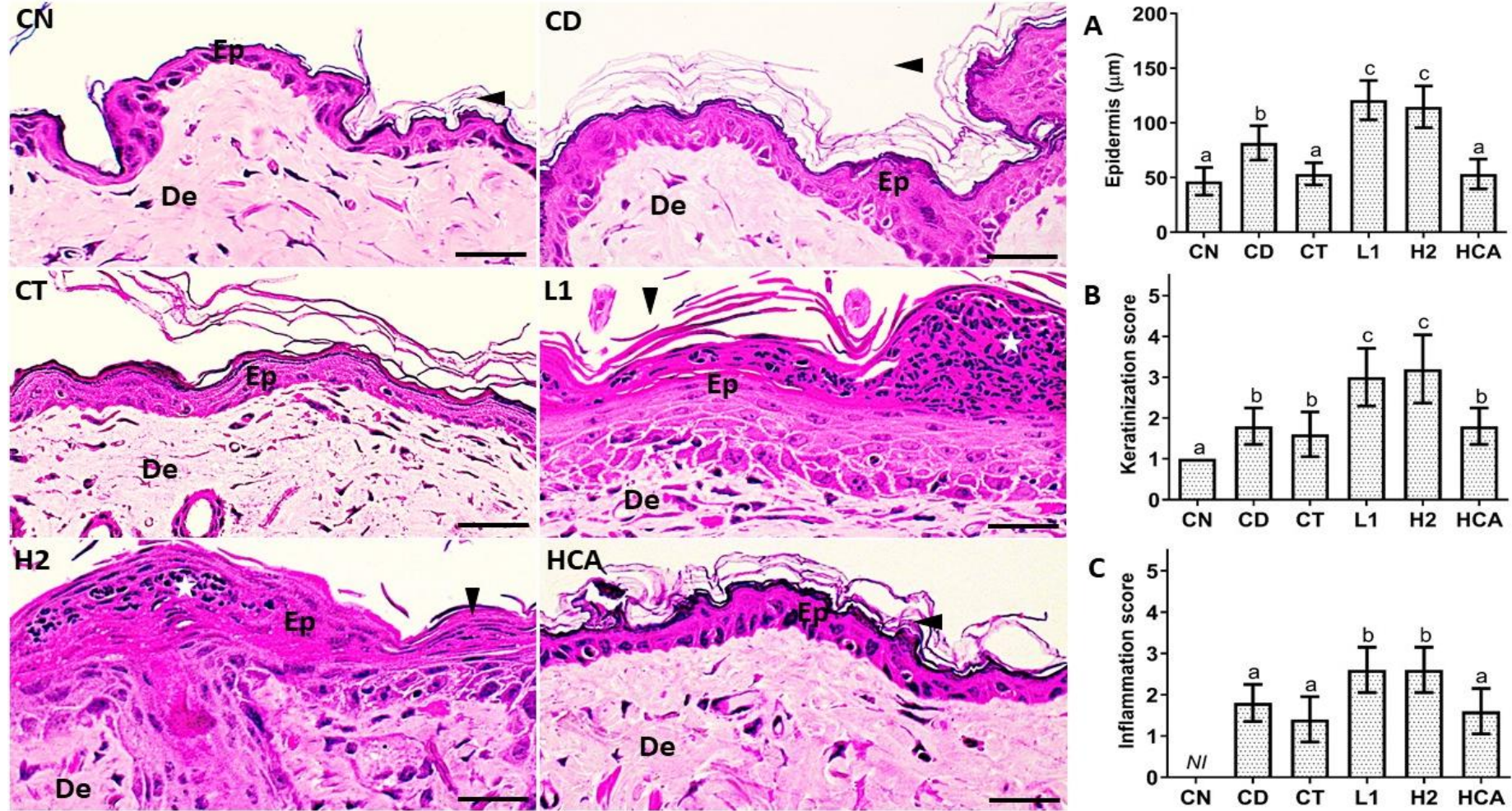
Figura 26 - Imagens macroscópicas da face dérmica dos fragmentos de pele coletados, representação do escore histopatológico (diagrama de campo hexagonal) de congestão vascular (A) e comprimento da rede macrovascular total (B) em camundongos controle e com dermatite psoriásica tratados com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nas imagens, os vasos sanguíneos são observados como filamentos em cor escura (preta ou marrom). O losango representa o efeito conjunto dos escores histopatológicos de todos os grupos. Grupos com escores histopatológicos mais elevados apresentam maior influência sobre o deslocamento do losango.



Fonte: Da autora

Como demonstrado na Figura 27, os animais do grupo controle apresentaram epiderme delgada e distribuição típica da queratina na camada córnea, caracterizada por delgadas lâminas de queratina frouxa. Os animais dos grupos CD, L1 e H2 apresentaram espessamento da epiderme comparado aos grupos CN, CT e HCA ($P < 0,05$). Inflamação e hiperqueratose leve ou moderada foram identificadas nos grupos CD, CT e HCA comparado ao grupo CN ($P < 0,05$). Acantose foi claramente identificada nos grupos L1 e H2, Este aumento da espessura da epiderme (acantose), geralmente devido ao espessamento do estrato espinhoso da pele e é uma das características histológicas encontradas na psoríase. Além disso, os animais dos grupos L1 e H2 ainda apresentaram marcante paraqueratose, hipogranulose, infiltrado inflamatório e microabscessos epidérmicos.

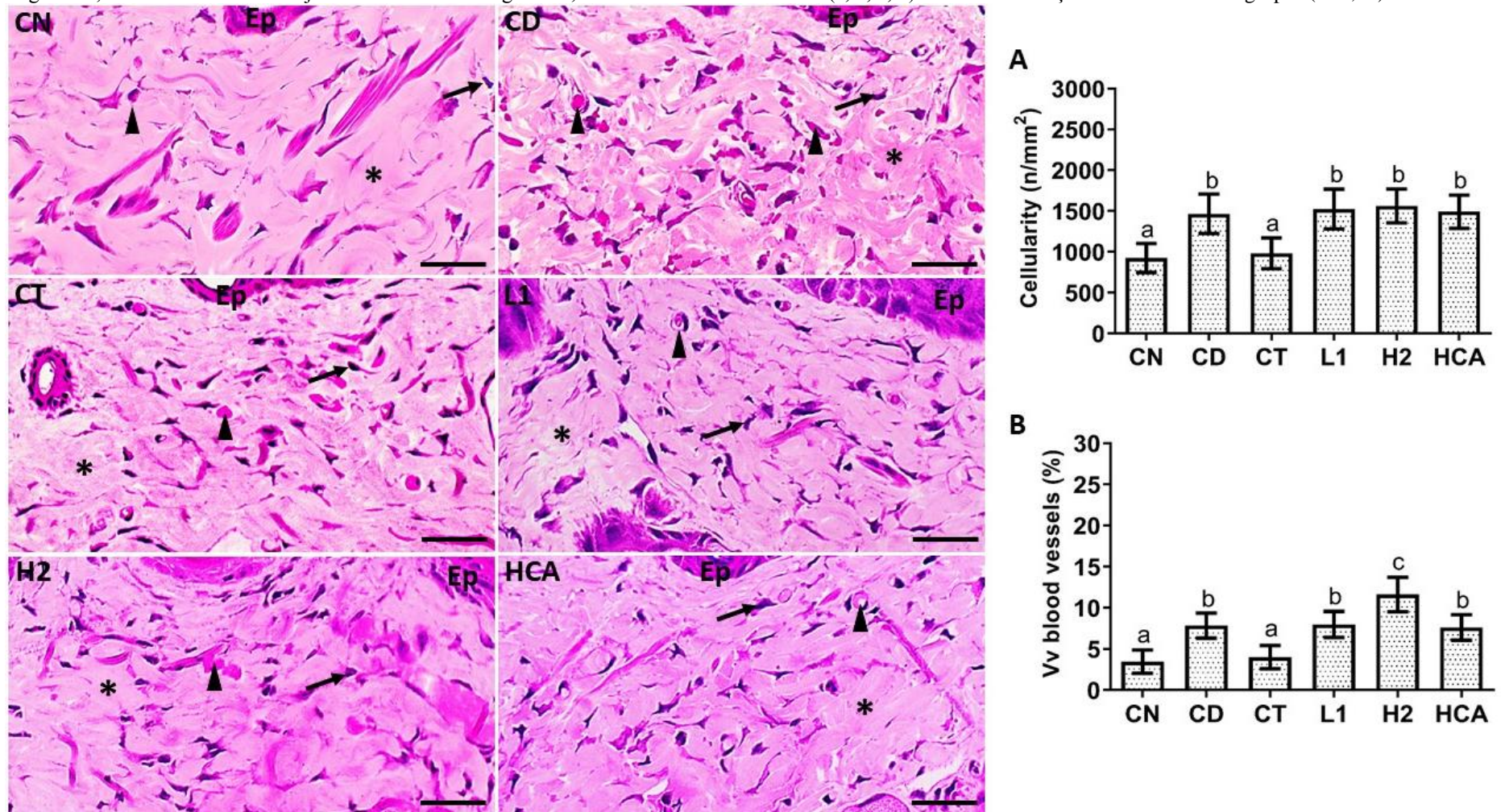
Figura 27 - Fotomicrografias da pele e parâmetros microestruturais (A-C) da epiderme de camundongos controle e com dermatite psoriática tratados com diferentes formulações de metotrexato - aumento de 40X. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Símbolos nas imagens: ▲Cabeça de seta= queratina, De= derme, Ep= epiderme, Estrela= microabscesso. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05). NI= não identificado.



Fonte: Da autora

A análise histopatológica da derme (FIGURA 28) indicou microestrutura normal da derme em animais do grupo CN, caracterizada por baixa celularidade, ampla distribuição de feixes de fibras colágenas bem definidos, vasos sanguíneos com lúmen estreito, perfis de células musculares lisas em distribuição difusa. A derme dos animais dos grupos CD, L1, H2 e HCA apresentaram maior celularidade e densidade de volume de vasos sanguíneos em relação aos grupos CN e CT ($P < 0,05$). Congestão e dilatação vascular foi claramente observada no grupo H2.

Figura 28 - Fotomicrografias da pele e parâmetros microestruturais da derme (A e B) de camundongos controle e com dermatite psoriáticapsoariática tratados com diferentes formulações de metotrexato – aumento de 40X. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Símbolos nas imagens: * Asterisco= Matriz colagênica, ▲ Cabeça de seta= vasos sanguíneos, →Seta= células do conjuntivo da derme. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).



Fonte: Da autora

Como indicado na Figura 29, os animais dos grupos CD, L1 e H2 apresentaram maior atividade de Ciclooxigenase (COX-2) e Mieloperoxidase (MPO) e maior produção de Prostaglandina-2 (PGE2) comparado aos grupos CN, CT e HCA ($P < 0,05$). A atividade de N-Acetil-D-Glucosamina (NAG) maior nos grupos CD e HCA comparado aos grupos CN e CT ($P < 0,05$). Esses parâmetros foram ainda maiores nos grupos L1 e H2 ($P < 0,05$).

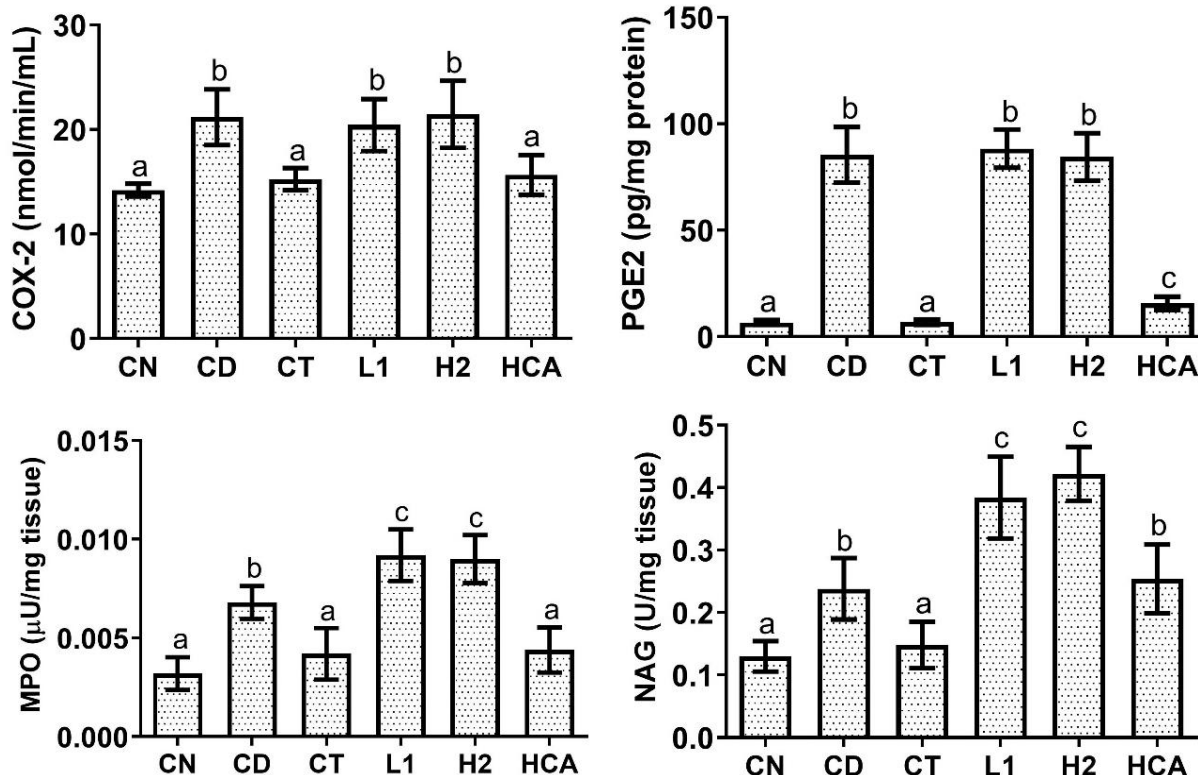
A COX-2 está presente nos locais de inflamação, sendo, por isso, denominada de enzima indutiva. Ela é expressa primariamente por células do processo inflamatório, como macrófagos e monócitos. Também se encontra em outros tecidos e órgãos, e é induzida pelas citocinas (IL-1, IL-2), fator de necrose tumoral e outros mediadores nos sítios de inflamação. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-14 (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente nos neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. A atividade exacerbada da MPO está relacionada à injúria tecidual presente em muitas doenças inflamatórias como artrite, arterioesclerose, doenças pulmonares entre outras (NOLDIN, 2011).

A PGE2 são substâncias similares aos hormônios, também chamadas de eicosanoides, produzidas por quase todas as células que participam do processo inflamatório como mastócitos, macrófagos, e plaquetas, geralmente em locais de dano tecidual ou infecção, envolvidos nas lesões e doenças. Elas controlam os processos, tais como a inflamação, o fluxo de sangue e a formação de coágulos de sangue. Tem importante ação vasodilatadora, permitindo extravasamento de plasma e migração de células em tecidos inflamados (SILVA, 2005).

A NAG (N-acetil glucosaminidase) é produto do metabolismo da glicose, um derivado da glucosamina naturalmente encontrado no organismo humano que juntamente com o d-glucuronato compõe o ácido hialaurônico, presente em todos os tecidos do corpo (CHOU *et al.*, 2015). A NAG é uma enzima lisossomal que é produzida por monócitos ativados, principalmente macrófagos. A medida de sua atividade é considerada um indicador indireto da presença de células mononucleares como mastócitos e macrófagos no local da inflamação (RAUH, 2008). (SILVA, 2009).

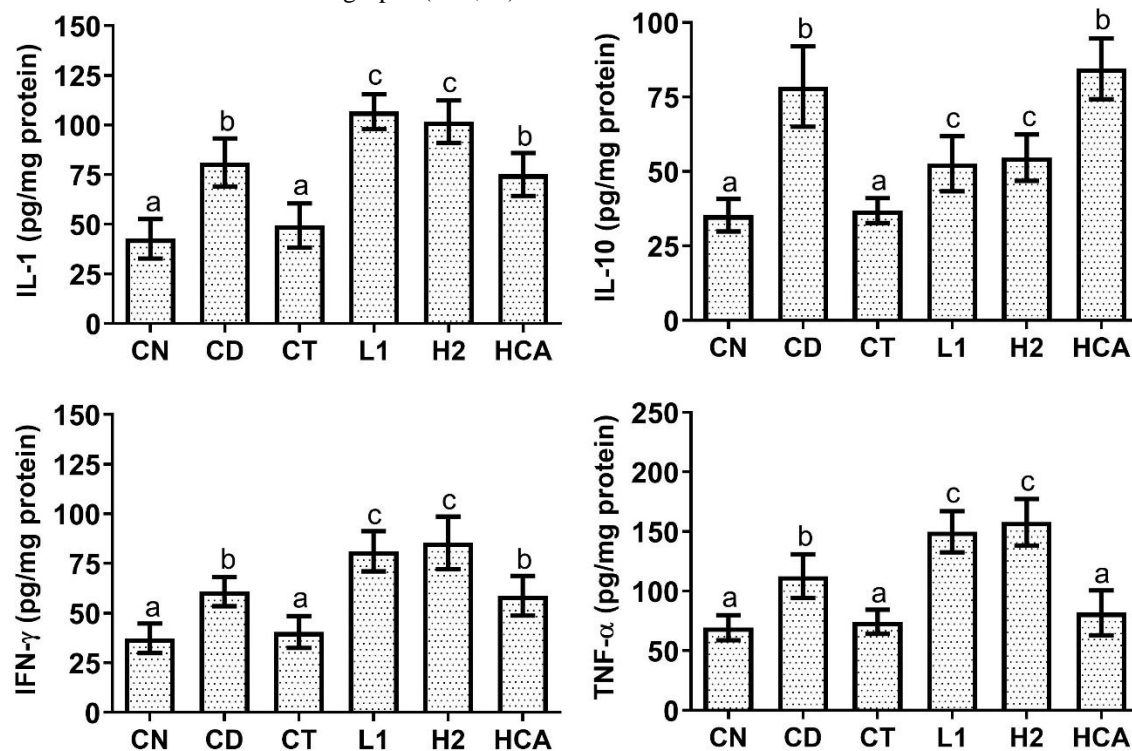
Figura 29 - Atividade de ciclooxigenase 2 (COX-2), mieloperoxidase (MPO), N-acetilglucosaminidase (NAG), e níveis de prostaglandina E2 (PGE2) na pele de camundongos controle e com dermatite psoriática tratados com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).



Fonte: Da autora

A análise imunoenzimática de citocinas na pele (FIGURA 30) indicou níveis elevados de IL-1 e IFN- γ na pele dos animais dos grupos CD e HCA comparados aos grupos CN e CT ($P < 0,05$). Esses parâmetros foram maiores nos grupos L1 e H2 em relação aos grupos CN, CD, CT e HCA ($P < 0,05$). Os níveis cutâneos de TNF- α no grupo CD foram mais elevados em relação aos grupos CN, CT e HCA ($P < 0,05$). Esse parâmetro foi maior nos grupos L1 e H2 comparado aos grupos CN, CD, CT e HCA ($P < 0,05$). Os níveis de IL-10 foram mais elevados nos grupos L1 e H2 comparado aos grupos CN e CT ($P < 0,05$). Esse parâmetro foi maior ainda nos grupos CD e HCA comparado aos demais grupos ($P < 0,05$).

Figura 30 - Níveis de citocinas na pele de camundongos controle e com dermatite psoriática tratados com diferentes formulações de metotrexato. CN= sem dermatite e sem tratamento; CD= IMQ, CT= IMQ + dexametasona creme, L1= IMQ + fórmula L1-MTX, H2= IMQ + fórmula H2-MTX, HCA= IMQ + fórmula HCA-MTX. Nos gráficos, letras diferentes nas colunas (a, b, c, d) indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).



Fonte: Da autora

Para que não haja efeitos colaterais e adversos muito intensos no tratamento com MTX, a proposta deste trabalho é oferecer uma melhora das lesões psoriáticas de maneira tópica. Após os resultados, formulação HCA se mostrou próxima ao tratamento controle com dexametasona, ou seja, apresentando melhora dos sintomas e da condição inflamatória da pele, reduzindo a hiperqueratose e espessura da epiderme.

No presente estudo, a formulação HCA demonstrou menor atividade inflamatória em comparação com as outras formulações. Em comparação com os grupos controle, esta formulação foi estatisticamente semelhante apenas pela atividade de COX-2 e MPO e diferente na atividade de PGE-2 e NAG.

Os resultados deste trabalho mostram que os CLs devem ser aplicados com cautela. Uma possível explicação para o efeito negativo visualizado para L1 e H2 pode estar na composição. O miristato de isopropila (MIP) é considerado um excipiente seguro e pode ser encontrado em vários produtos para uso tópico registrado no FDA. De acordo com uma busca realizada na base de dados “Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products”, pode

ser encontrado produtos tópicos e transdérmicos contendo MIP na faixa entre 0,01mg/mg até 41,3% p/v. Já a consulta do polissorbato 80 (Tween[®] 80) na mesma base de dados mostra produtos tópicos registrados com um limite até 15% p/v. Este valor não é um limite de segurança, apenas uma referência de que há um produto registrado com esta quantidade. L1 e H2 possuem 60 e 50% p/p, respectivamente, além da alta quantidade de tensoativo, pode estar relacionada com os efeitos inflamatórios observados.

Portanto, os resultados deste trabalho são muito importantes para atualizar o estado da arte com relação à aplicação dos cristais líquidos com cautela quando se trata de sistemas tópicos. As altas concentrações dos tensoativos e lipídeos necessários para obter a nanoestrutura podem ter um efeito negativo quando se trata de tolerância dérmica.

HCA é composto por carbômero alquilado C10-C30, um emulsionante polimérico conhecido por sua baixa irritabilidade e bom sensorial, além de promover a formação de uma camada oclusiva na pele, promovendo a liberação do fármaco (Pemulen[™], Lubrizol). HCA, apesar de ser um hidrogel, seu polímero contém cadeias alquílicas C10-C30 que podem ter atuado no efeito oclusivo da pele de maneira mais eficiente, sem irritabilidade.

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o principal objetivo foi desenvolver sistemas tópicos para administração cutânea do MTX no tratamento da psoríase, pois apresentam inúmeras vantagens quando comparados às formulações de uso sistêmico. O delineamento de formulações do tipo sistemas líquido cristalinos e hidrogéis como veículos são promissores, na tentativa de promover melhor permeação do fármaco na pele.

A partir do diagrama de fases, foram selecionadas 4 formulações do tipo sistemas líquido-cristalinos preparado a partir da mistura dos componentes miristato de isopropila, polissorbato 80 (Tween 80[®]) e água purificada. Além destas formulações, foram também selecionados 3 tipos de hidrogel: gel de quitosana, gel de hidroxipropilmetilcelulose e gel de Pemulen[®];

A técnica de microscopia de luz polarizada permitiu visualizar a organização interna dos sistemas e classificá-los como sistema líquido cristalinos de fase lamelar e fase hexagonal (L1, L2, H1, H2);

Foi testado hidrogéis com diferentes pHs para verificar a solubilidade e o comportamento do MTX (forma catiônica, aniônica e zwitteriônica) e o pH que mais solubilizou o MTX (2 mg/mL) foi pH=7,4 no hidrogel HCA (Pemulen - carbono alquilado);

Nos ensaios de reologia, verificou-se que, G' era sempre maior que G'' , sendo então sistemas mais elásticos que viscosos. A inclinação das curvas é menor para H2, mostrando ser o sistema com maior estruturação. Quando há a incorporação do MTX, o G' das amostras, aumentaram sugerindo que a estrutura molecular do fármaco pode estar participando da formação da rede tanto líquido cristalina como do hidrogel.

O gel de HCA não exibiu tixotropia no reograma de fluxo, porque a curva ascendente se sobrepôs com a curva descendente. Esta característica é desejável, pois sua administração tópica é facilitada pela diminuição da viscosidade do gel na aplicação da força de cisalhamento devido às partículas se alinhando em a direção do fluxo. Quando essa força é cessada, o gel volta rapidamente a configuração estrutural inicial viscosa de forma independente do tempo, o que auxilia na adesão destes géis para a pele (SILVA *et al.*, 2017.).

Nos testes utilizando analisador de textura, o teste TPA mostrou que as fases hexagonais H1 e H2 apresentaram valores de compressão e adesão semelhantes e bem maiores que as fases lamelares L1 e L2. O hidrogel HCA obteve valores de compressão e

adesão intermediários entre L1 e L2. Já nas análises de bioadesão, a amostra lamelar L1 apresentou maior bioadesão que as fases hexagonais. Com relação ao hidrogel HCA, este apresentou maior bioadesão do que o CLs. Estes resultados mostram que formulações com estrutura mais rígida como fases hexagonais não necessariamente correlacionam com melhor bioadesão.

A adesividade e coesividade das formulações dos hidrogéis garantem a adesão prolongada da formulação em superfícies biológicas. Estas características são desejáveis para produtos tópicos, incluindo aceitabilidade pelo paciente, espalhabilidade e resistência à fricção. Essas características mecânicas fornecem informações sobre as interações entre os componentes do sistema que é importante no desenvolvimento de formulações tópicas bioadesivas. A bioadesão têm sido estudada nos hidrogéis, mostrando que estes são bons veículos para fármaco de uso tópico. Sistemas como os CLs também apresentam valores semelhantes aos dos hidrogéis e, portanto, são bons candidatos como sistemas de administração tópica de medicamentos, pois esses sistemas anfílicos têm mostrado capacidade bioadesiva, biocompatibilidade e liberação controlada de drogas.

Estudos de Fonseca-Santos *et al.* (2017) afirmam que hidrogéis compostos de homopolímero de carbômero que é um polímero de ácido poliacrílico levemente reticulado comumente utilizado em sistemas de baixa viscosidade, oferecem valores aceitáveis pois exibem um valor de alta coesividade, o que indica que sua estrutura é estável, pois sua estrutura original é rapidamente restaurada após o primeira compressão. Isso confirma os resultados reológicos mencionados acima, indicando que o hidrogel de HCA tem um matriz estável e fácil de ser administrada, o que faz ele ser um veículo promissor para aplicação tópica de medicamentos.

O método analítico para quantificação do MTX por CLAE foi validado, onde se obteve valores satisfatórios de linearidade, especificidade, Limite de Quantificação, Limite de Detecção, precisão e exatidão, adequados para quantificação do MTX nos ensaios de liberação.

O ensaio de liberação *in vitro* foi feito com as formulações contendo o MTX saturado (10mg/mL) na tentativa de aumentar a liberação e após 36h de avaliação, verificou-se que o tempo máximo de liberação foi de 6 horas. Identificou-se que as formulações hexagonais (H1 e H2) retiveram mais o MTX do que as formulações lamelares (L1 e L2), ou seja, liberaram menos fármaco/tempo devido a sua estrutura mais rígida e organizada. O hidrogel HCA liberou mais MTX constatando que a rede líquido cristalina retém mais a liberação de MTX do que uma rede polimérica gelificada. Todas as formulações apresentam cinética de

liberação cujos parâmetros obtidos sugerem que o mecanismo se caracteriza por uma curva exponencial. Os critérios utilizados para avaliação e comparação das formulações foram o valor de R^2 ajustado (valores maiores que 0,95) confirmando o modelo Weibull como o melhor perfil de liberação das formulações, sendo considerado um modelo empírico que quando apresenta coeficiente b com valores maiores que 1, indica curvaturas ascendentes seguidas de um ponto de mudança de inclinação, como sigmóides (em formato de “S”), um mecanismo de liberação complexo comumente adaptado em estudos de novas formas farmacêuticas que apresentam mecanismo de difusão do fármaco difíceis de serem descritos, pois o transporte dos fármacos, de uma maneira geral, envolvem diversos fenômenos físicos e químicos no interior dos sistemas farmacêuticos.

O mecanismo de liberação dos CLs pode estar relacionado com a difusão do fármaco através das regiões polares e apolares da estrutura líquido-cristalina, resultando num mecanismo mais complexo. O HCA é hidrogel e provavelmente o mecanismo de liberação está associado ao intumescimento da rede polimérica e difusão do fármaco através do gel.

Polímeros são substâncias constituídas por um ou mais tipos de monômeros ligados em cadeia linear ou ramificada. Cadeias lineares comportam, somente, um tipo de unidade monomérica enquanto que, polímeros constituídos por mais de um tipo de monômero, chamados de copolímeros, apresentam estrutura reticulada, onde as unidades estão dispostas de forma aleatória, alternada ou sequencial. O Pemulen[®] é um dos copolímeros do ácido acrílico modificados por grupos acrilatos de alquila e ligados ao alil pentaeritritol. O estabelecimento de ligações covalentes, iônicas ou de pontes de hidrogênio, entre as cadeias poliméricas, pode levar a formação de polímeros com cadeias tridimensionais, capazes de prolongar o efeito da liberação dos fármacos. Porém, como a rede de HCA não é tão organizada como dos CLs, sua liberação foi mais rápida.

Para um melhor entendimento da liberação do fármaco em contato com a pele, este estudo poderia ser complementado com o teste de permeação *in vitro* com a pele da orelha de porco dermatomizada para avaliação da retenção e permeação do MTX nas camadas da epiderme pele.

Nos estudos *in vivo* com modelo experimental para dermatite psoriática induzida por IMQ, foi testado seis grupos (3 grupos controle e 3 formulações) e os testes realizados foram: avaliação macroscópica da face dérmica, análise histopatológica da epiderme e derme superior, atividade de COX-2, MPO, PGE2 e de NAG e análise imunoenzimática de citocinas e de maneira geral, a formulação HCA (hidrogel) apresentou resultados semelhantes aos grupos controle com uma melhora da dermatite psoriática maior do que os cristais líquidos.

De acordo com Silva (2009), quando um processo inflamatório torna-se crônico, as células mononucleares são ativadas, sofrem degranulação e promovem a liberação de uma bateria de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, que promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, o que leva ao aumento do processo inflamatório. Este processo inflamatório foi confirmado pela análises de dosagem dos mediadores inflamatórios.

Na derme, os linfócitos T se encontram e interagem com as células dendríticas e macrófagos, formando novas sinapses imunológicas e produzindo inúmeras citocinas, que instalam e amplificam o processo inflamatório. Há também fatores de crescimentos e TNF- α envolvidos neste processo que favorecem a angiogênese e a hiperproliferação celular.

A imunopatogênese da psoríase é complexa e envolve alterações do sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais) e adaptativo (linfócitos T). Os linfócitos T ativados pela psoríase produzem diversas citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-17, IL-6, IL-22 e outras substâncias envolvidas no processo inflamatório. O TNF- α estimula no queratinócito a produção de ILs e proteínas quimiotáticas para neutrófilos, além de aumentar a produção de linfócitos T, de IL-1 e do próprio TNF- α , além de fatores de crescimentos. Essa cascata de reações induz a produção de inúmeras proteínas inflamatórias (SANCHEZ, 2010).

Lee *et al.* (2012) estudaram formulações contendo MTX para tratamento da artrite reumatoide e após análises das citocinas inflamatórias por imunohistoquímica em camundongos afirmaram que as expressões de TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS e COX-2 se mostraram reduzidas quando tratadas de maneira percutânea sendo dependente da dose, confirmando esta redução quando as concentrações dessas citocinas foram dosadas no soro em mais de 70% dos camundongos e ainda reduziu significativamente os níveis de enzimas destrutivas nas articulações inflamadas. A formulação de uso tópico permaneceu no local da aplicação sem irritação cutânea significativa, alterações histológicas ou disfunção nos órgãos mostrando vantagens sobre o tratamento sistêmico.

A IL-10 é produzida por monócitos e células Th2, mastócitos e também em um certo subconjunto de células T e células B ativadas. A IL-10 pode exercer tanto efeitos imunossupressores ou efeitos imunoestimulatórios em uma variedade de tipos de células. É um potente inibidor de monócitos / função do macrófago, suprimindo a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1) e IL-8, embora a liberação de quimiocina antiinflamatória (MCP-1) seja aumentada. A expressão de IL-10 por células apresentadoras de antígeno (CAA) pode ser uma

via estabelecida para a indução de tolerância específica de antígeno como a de alérgenos. Em contraste, a IL-10 regula positivamente expressão do monócito de IL-1Ra, outra citocina antiinflamatória, sem efeitos diretos nos queratinócitos contribuindo para o efeito antipsoriático, ou seja, uma terapia bem tolerada e imunologicamente eficaz. O polimorfismo genético e a expressão da IL-10 é um potencial marcador imunológico no tratamento da psoríase e outras doenças autoimunes (AL-ROBAEE *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Outros estudos de Asadullah *et al.* (2001) e Hensen *et al.* (2003) confirmam a utilização da indução da expressão de IL-10 em terapias antipsoriáticas.

Asadullah *et al.* (2004) afirmam que baixo nível de expressão de IL-10 encontrado em pacientes com psoríase pode ter relevância fisiopatológica para esta doença imunológica. A indução da expressão de IL-10 foi encontrada por terapias antipsoriáticas convencionais, apoiando a hipótese de que IL-10 pode ser uma citocina chave na psoríase e que a própria aplicação subcutânea dessa citocina pode ter efeitos terapêuticos.

No presente estudo, foi verificado um aumento da IL-10 e diminuição de INF- γ , TNF- α nos grupos CD e HCA com relação às outras formulações testadas, sugerindo que a indução desta citocina pode estar relacionada à melhora da dermatite psoriática pelos fatores já citados anteriormente por Al-Robae *et al.* (2008).

Esta análise imunoenzimática das citocinas reafirma os demais testes já analisados anteriormente, pois a dermatite psoriática tem como sintomas a inflamação, descamação e aumento da espessura da pele, confirmando que após o tratamento, não houve a cura total destes sintomas, porém a formulação HCA se mostrou mais próximos dos controles e melhores do que as formulações L1 e H2.

Nos estudos de Rajitha e Sabitha (2017) há relatos que há efeitos benéficos do MTX na psoríase em aplicações tópicas, pois foram testados formulações variadas como hidrogel, solução e nanogel de quitosana, mas há duas possibilidades que devem ser avaliadas: a formulação poderá ficar retida na epiderme permitindo que o MTX atue no local, nos queratinócitos proliferados ou em células T estimuladas na pele, causando atividade anti-psoriática ou, dependendo da formulação, haverá permeação do MTX ficando retido em camadas mais profundas da derme, aumentando as chances de entrada do fármaco na circulação sistêmica, podendo exibir atividade anti-psoriática por mecanismos sistêmicos.

Neste trabalho, foi explorado como veículos CLs e hidrogéis. Os cristais líquidos são muito explorados como sistemas de liberação de fármacos e, especificamente para a pele, o caráter anfifílico do sistema, associado à sua nanoestrutura, pode favorecer tanto a oclusão como penetração do fármaco através do estrato córneo. De acordo com a publicação de

Lapteva & Kalia (2013) em “Expert Opinion on Drug Delivery”, há vários estudos reportados na literatura empregando fases lamelares e hexagonais para aplicação tópica e transdérmica; porém, há poucos estudos focando na tolerância destes sistemas.

Apesar dos CLs serem comumente reportados como veículos promissores para administração tópica, este trabalho mostrou evidências da baixa tolerabilidade da pele frente à sua aplicação. Foi sugerido que a alta concentração do tensoativo, necessária para obtenção destes sistemas, pode ser promotor deste efeito negativo. Então, para confirmar tal afirmativa, uma sugestão de continuidade deste estudo seria adicionar no teste *in vivo* grupos com a formulação vazia (sem MTX), e também a administração de cada componente dos CLs isolados, para confirmar a segurança de cada um. Mesmo assim, a aplicação de CLs à pele deve ser considerada com cautela, sendo sempre associada com estudos de segurança.

Este trabalho mostrou o grande potencial dos hidrogéis formados por polímeros alquilados, que por seu caráter anfifílico e cadeias alquílicas, pode também promover um efeito oclusivo na pele, além de se mostrar um bom veículo para o MTX. Seu efeito na recuperação da pele psoriática *in vivo* foi tão eficiente quanto ao tratamento com dexametasona (fármaco controle utilizado). Outra questão que poderia ser estudada é a comparação de outros hidrogéis com polímeros não alquilados para avaliação *in vivo* da eficácia no tratamento da dermatite psoriática, inclusive modificando a concentração destes polímeros, apesar de já haver outros trabalhos citados com polímeros como a hidroxietilcelulose e quitosana. Sugere-se estudar a estabilidade a longo prazo da formulação de carbômero alquilado (Pemulen[®]) pois obteve melhores resultados na melhoria da dermatite psoriática. Contudo, neste estudo foi possível verificar que o MTX pode ser utilizado pela via tópica no tratamento da psoríase, apresentando bons resultados, e, podendo, portanto, ser considerado como uma nova abordagem para o tratamento da psoríase.

8 CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento dos cristais líquidos lamelares e hexagonais e hidrogéis escolhidos para veicular o MTX em pH 7,4, as formulações foram submetidas aos testes *in vitro* de reologia oscilatória, textura, bioadesão e liberação pela célula de Franz, foi possível verificar que o CLs e hidrogel de HCA apresentaram parâmetros críticos de qualidade adequados à uma formulação tópica. Porém, nos testes *in vivo* em camundongos com psoríase induzida com IMQ, os CLs apresentaram efeito negativo e o hidrogel HCA apresentou resultados semelhantes ao controle positivo. Portanto, sugere-se que o MTX pode ser utilizado na forma tópica para o tratamento da psoríase. Este estudo mostra como a escolha correta dos componentes a serem utilizados no veículo e estudos com relação à toxicidade e segurança são importantes para ter uma formulação de uso tópico viável.

REFERÊNCIAS

ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis, **Cancer Chem. Pharmac.**, v. 71, p. 1115–1130, 2013.

ABREU, F.O.M. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia)- Departamento de Materiais da Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 37, DE 3 DE AGOSTO DE 2011**. Brasília, 21 agosto de 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0037_03_08_2011.html. Acesso em: 16 dez. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016**. Brasília, 15 fevereiro de 2016. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/legislacoes/abifisa-consulta-publica-n-129-de-12-de-fevereiro-de-2016.pdf>. Acesso em: 09 set. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Brasília, 2019. v.1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/IFA+e+ESP+Pronto.pdf/1d16f9e9-affc-495b-bb8f-6806c2cef0fe>. Acesso em: 20 julho 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **RDC Nº 166, DE 24 de julho de 2017**. Brasília, 25 julho 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 16 maio 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **RESOLUÇÃO – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003**. Brasília, 02 junho 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b. Acesso em: 16 maio 2019.

AL-ROBAEE, A. A. et al. IL-10 Implications in psoriasis. **International Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 1, p. 53-58, Jan. 2008.

ALVAREZ-FIGUEROA, M.; 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.

AMARJI, B.; GARG, N. K.; SINGH, B.; KATARE, O. P. Microemulsions mediated effective delivery of methotrexate hydrogel: more than a tour de force in psoriasis therapeutics. **J. Drug. Target.**, Early Online, p.1–14, 2015.

AMORIM, A. A. P. O. **Caracterização reológica da mistura de carboximetilcelulose com amido de milho e avaliação da microestrutura para estudo de viabilidade em aplicações**

tecnológicas. 2012. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Polímeros) - Centro Universitário da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

AOUADA, F., A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para a liberação controlada de pesticidas**. 2009. 141f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ASADULLAH, K. *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis. **J Invest. Dermatol.**, v. 116, n. 6, p. 975-978, June, 2001.

ASADULLAH, K. *et al.* Interleukin-10: An important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. *Curr Drug Targets. Inflamm Allergy.*, v. 3, n. 2, p. 185-192, June, 2004.

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.**, Early Online, p. 1 - 9, 2015.

BENSON, H.A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery: principles and practice**, Hoboken, New Jersey, 2012.

BESSAR, H. *et al.* Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible for treatment of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p.141–147, jan. 2016.

BOEHNCKE, W.; SCHÖN, M. P. Psoriasis. **Lancet.**, v. 386, p. 983–994, May, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Brasília, 24 jan.2018. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 25 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria nº 1229, de 5 de novembro de 2013**. Brasília, 5 nov. 2013. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/ANEXO/anexo_prt1229_05_11_2013.pdf. 2018. Acesso em: 09 maio 2019.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão pesticidas. **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, jan./dez., 2003.

BRUSCHI, M. L. *et al.* Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease:in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 96, n. 8, p. 2074-2089, Aug., 2007.

CANELLA, K. M. N. C; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. **Quím. Nova**, v. 24, n.1, jan./fev., 2001.

CARRASCOSA, J. M. *et al.* Methotrexate in moderate to severe psoriasis: review of the literature and expert recommendations. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 107, n. 3, p. 194-206, Apr., 2016.

CARVALHO, F. C. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, n.1, p, 1-17, 2010.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal da zidovudina.** 2012. 172f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

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

CENFE. 2019. Disponível em: <https://cenfewc.com.br/faq/quais-sao-as-camadas-da-pele-e-suas-caracteristica/>. Acesso em: 10 de maio, 2020.

CHAGAS, G. R. **Desenvolvimento de um hidrogel de quitosana como método alternativo à produção de hidrogéis comerciais.** Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CHEN, Y; M. A , P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, June, 2014.

CHORILLI, M. *et al.* Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 182–188, 2011.

CHOU, W.Y. *et al.* Inhibition of pkc-induced cox-2 and il-8 expression in human breast cancer cells by glucosamine. **J Cell Physiol.**, v. 230, n.9, p. 2240-51, 2015.

CID, Y. P. *et al.* In vitro characterization of chitosan gels for buccal delivery of celecoxib: influence of a penetration enhancer. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 13, n. 1, Mar. 2012.

CINTRA, G. A. S. *et al.*. Bioadhesive surfactant systems for methotrexate skin delivery. **Molecules.**, v. 21, n. 21, 2016.

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

DA SILVA, S. E. A. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice. **Biomed Pharmacother.**, v. 107, p. 1311-1317, 2018.

DAMASCENO, B. P. G. L. *et al.* Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DANCIU, C. *et al.* The effect of electroporation of a lyotropic liquid crystal genistein-based formulation in the recovery of murine melanoma lesions. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 15425-15441, 2015.

DE MENDIBURU, F. **Tutorial de agricolae** (Versión 1.2-8). 2017.

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. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 50-58, Aug., 2016.

DERMOTREX, 2020. Disponível em: <https://www.1mg.com/drugs/dermotrex-1-gel-512927>. Acesso em 10 ago., 2020.

DINU, M. V. *et al.* Comparative rheological study of ionic semi-IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and dextran sulphate and of polyacrylamide hydrogels. **Colloid and Polymer Science.**, v. 290, n. 16, p. 1647-1657, 2012.

DOENÇAS AUTO-IMUNES. Brasil: Filipa Carioca, 2008. Disponível em: <http://autoimunidade.blogspot.com/2008/05/psorase.html>. Acesso em: 24 abr. 2019.

DOGRA, S.; MAHAJAN, R. Systemic methotrexate therapy for psoriasis: past, present and future. **Clin. Exper. Dermatol.**, v. 38, p. 573-588, 2013.

DRESSLER, A. C. **Propriedades reológicas compostos sol-gel de quitosana/ glicerol/ nanoelementos.** (2018). Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

FAGNANI, S. *et al.* Cuidados básicos com pele. Revista De Trabalhos Acadêmicos – Campus Niterói, n. 8, 2013.

FARKAS, E.; KISS, D., ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. **Int. J. Pharm.**, v. 340, n. 1-2, p. 71-75, 2007.

FCIÊNCIAS, 2011-2019. Disponível em: <https://www.fcencias.com/2019/04/04/miristato-de-isopropilo-molecula-da-semana/>. Acesso em 18 jul. 2020.

FELIZARDO A. A. *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. **Free Radic Biol Med.**, v. 129, p. 227-236, 2018.

FERREIRA, S. B. D. S. *et al.* Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of polycarbophil polymer blends for biomedical applications, **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 68, p. 265-275, 2017.

FERREIRA, S. B. S. *et al.* Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of polycarbophil polymer blends for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 68, p. 265-275, Apr., 2017.

FITS, V. D. L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the il-23/il-17 axis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5836–5845, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>. Acesso em: 06 fev. 2019.

FLUHR, J. W.; CAVALLOTTI, C.; BARARDESCA, E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 380-386, 2008.

FONSECA-SANTOS, B.; *et al.* Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of *in vivo* anti-inflammatory activity. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p. 6883–6893, 2017.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA), 2020. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=BasicSearch.page>. Acesso em: 18 ago. 2020.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 03, jul./set., 2005.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1-9, 2015.

GOMAN, T. Identifying the different clinical presentations of psoriasis. **JCN**, v 31, n. 2, 2017.

GONÇALVES R. V. *et al.* Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of Brassica oleracea on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathol Res Pract.**, v. 209, n. 10, p. 648-653, 2013.

GONÇALVES R.V. *et al.* 5 α -Dihydrotestosterone enhances wound healing in diabetic rats. **Life Sci.**, v. 152, p. 67-75, 2016.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Bathysa cuspidata extract modulates the morphological reorganization of the scar tissue and accelerates skin wound healing in rats: a time-dependent study. **Cells Tissues Organs.**, v.199, n.4, p. 266-277, 2014.

GOODBY, J. W. *et al.* **Handbook of liquid crystals**. Weinheim: Wiley-VCH, 2014. v.3, p.629.

GREENBERG, R. Topical psoriasis therapies and unmet patient needs: the importance of optimizing methotrexate. **Cutis**, v. 97, n. 1, p. 55-56, Jan., 2016.

GUEDES-DA-SILVA F.H. *et al.* *Trypanosoma cruzi* antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. **Microvasc. Res.**, v. 97, p. 130-136, 2015.

HENSEN, P. *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism IL10.G and familial early onset psoriasis. **Br J Dermatol.**, v. 149, n. 2, p. 381-385, 2003.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. 206 – 212, nov. 2006.

HOSMER, J. M.; STEINER, A. A.; LOPES, L. B. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: impact of the monoglyceride. **Pharm Res.**, v. 30, p. 694–706, 2013.

IMIQUIMODE CREME. 2019. Disponível em: <http://www.minhavidade.com.br/saude/bulas/898-imiquimode-creme>. Acesso em: 09 mai. 2019. Bula de remédio.

IMIQUIMODE. 2019. Disponível em: <https://www.bulario.com/imiquimode/>.2018. Acesso em: 09 mai. 2019. Bula de remédio.

IWAI, H.; FUKASAWA, J.; SUZUKI, T. A liquid crystal application in skin care cosmetics, **Internacional Journal of Cosmetic Science**, v. 20, n. 2, p. 87-102, 1998.

JABUR, M. S.; GHAZAL, M. R. I.; AL-HAMAMY, H. R. Topical methotrexate for treatment of psoriasis: formulation and clinical implications. **J Fac Med Baghdad.**, v. 52, n. 1, 2010.

JAIN, S.; PATEL, N.; MADAN, P.; LIN, S. Formulation and Rheological Evaluation of Ethosome-loaded Carbopol Hydrogel for Transdermal Application. **Drug Development and Industrial Pharmacy.**, v. 42, n.8, Jan., 2016.

JAVADZADEHA, Y. *et al.* Enhancing percutaneous delivery of methotrexate using different types of surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 422–426, 2011.

JOHANSSON, M. *et al.* Physicochemical and drug delivery aspects of lipid-based liquid crystalline nanoparticles: a case study of intravenously administered propofol. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, n. 9-10, p. 3017- 3024, 2006.

JONES, D.S.; LAVERTY, T. P.; MORRIS, C.; ANDREWZ, G.P. Statistical modelling of the rheological and mucoadhesive properties of aqueous poly (methylvinylether-co-maleic-acid) networks: Redefining biomedical applications and the relationship between viscoelasticity and mucoadhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p.125-134, Aug. 2016.

KALIANDRA CAINELLI. 2019. Disponível em: <http://kaliandra.com.br/o-que-e-psoriase-e-como-tratar/>. Acesso em: 01 maio, 2019.

KASHIWABARA, T. B. *et al.* **Medicina ambulatorial IV**. Montes Claros: Dejan Gráfica e Editora, 2016. 560p.

KIM, B. Y. *et al.* Histopathological findings are associated with the clinical types of psoriasis but not with the corresponding lesional psoriasis severity index. **Ann Dermatol.**, v. 27, n. 1, p. 26-31, 2015.

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

KIM, K. E. *et al.* Therapeutic Effects of Erythroid Differentiation Regulator 1 on Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 244, 2016.

KIM, S. D. *et al.* Evaluation of skin surface hydration in Korean psoriasis patients: a possible factor influencing psoriasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 72, n. 2, p. 147-152, 2002.

KUMAR, B; SANDHU, K; KAUR, I. Topical 0.25% methotrexate gel in a hydrogel base for palmoplantar psoriasis. **The Journal of Dermatology**, v. 31, n. 10, p. 798-801, Nov., 2004.

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. Applied 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.

LAPTEVA, M.; KALIA, Y.N. Microstructured bicontinuous phase formulations: their characterization and application in dermal and transdermal drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 10, n. 8, p. 1043-1059, 2013.

LASHMAR, U. T.; HADGRAFT, J.; THOMAS, N. Topical application of penetration enhancers to the skin of nude-mice - a histopathological study. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 118-121, 1989.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 89-121, Dec., 2000.

LEE, A. *et al.* Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. **Biomaterials**, v. 33, p. 1563-1572, 2012.

LEE, K. W. *et al.* Of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. **Int. J. Pharm. Amsterdam.**, v. 365, n. 1-2, p. 190-199, Jan., 2009.

LI, Y. *et al.* Lamellar liquid crystal improves the skin retention of 3-o-ethyl-ascorbic acid and potassium 4-methoxysalicylate in vitro and in vivo for topical preparation. **AAPS PharmSciTech.**, v. 17, n. 3, June, 2016.

LIMÓN, D. *et al.* Nanostructured supramolecular hydrogels: Towards the topical treatment of Psoriasis and other skin diseases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 181, p. 657-670, 2019.

LIN, Y. *et al.* Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drugs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-19, Sept., 2015.

LIU, X. *et al.* Determination of methotrexate in human serum by high-performance liquid chromatography combined with pseudo template molecularly imprinted polymer. **Journal of Chromatography**, v. 1216, p. 7533–7538, 2009.

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.

MACEDO, E. M. S.; CARNEIRO, R. C.; MATAYOSHI, S. Nova modalidade no tratamento do carcinoma basocelular periocular: imiquimode. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v.66, n. 6, nov/dez., 2007.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, p. 2–19, 2011.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995.

MARQUES, A. S. **Metotrexato na psoríase**. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso brasileiro de psoríase e guias de tratamento. p. 61-66, 2009. Disponível em: <http://www.escs.edu.br/arquivos/ConsensoBrasPsoriase2009.pdf#page=63>. Acesso em: 10 mai. 2019.

MARTINS, G. A.; ARRUDA, L. Tratamento sistêmico da psoríase - parte I: metotrexato e acitretina. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 3, p. 263-278, May/June, 2004.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MENDONÇA, A. A. S. *et al.* Could phenothiazine-benznidazole combined chemotherapy be effective in controlling heart parasitism and acute infectious myocarditis?. **Pharmacol Res.**, v. 158, Aug., 2020.

MENG, Y. *et al.* Paeonol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skinlesions in BALB/c mice by inhibiting the maturation and activation of dendritic cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 5, p. 1101–1110, 2017.

MIRTIC, T. *et al.* Development of medicated foams that combine incompatible hydrophilic and lipophilic drugs for psoriasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, n. 1-2, p. 65–76, Mar/Mayo, 2017.

MOHAMMADI-SAMANI, S. *et al.* Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. **Res. Pharm. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 25–33, 2013.

NETO, C. F. Tratamento tópico do carcinoma basocelular superficial e nodular pelo imiquimod creme a 5%: observação de 10 casos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 77, n. 6, nov/dez. 2002.

NOLDIN, V. F. **Estudos in vitro e in vivo da atividade próinflamatória e antitumoral de derivados maleimídicos.** 2011. 178f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

NOVAES, R. D. *et al.* Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy. **Life Sci.**, n. 152, p. 210-219, 2016.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

OLIVEIRA C. M. B. *et al.* Cytokines and pain. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OYAFUSO, M. H.; *et al.* Design and characterization of silicone and surfactant based systems for topical drug delivery. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 817-826., Jan., 2015.

PALMER, B. C.; DELOUISE, L.A. Nanoparticle-enabled transdermal drug delivery systems for enhanced dose control and tissue targeting. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 1719, Dec., 2016.

PAPADOPOULOU, V. Kosmidis, K.; Vlachou, M.; Macheras, P.;. On the use of the Weibull function for the discernment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 17, p. 44-50, Febr., 2006.

PBWORKS, INC, 2020. Disponível em:<
<http://pemulentr2.pbworks.com/w/page/15636419/Pemulen%20TR2>>. Acesso em 18 jul., 2020.

PINTO M. F. *et al.* A new topical formulation for psoriasis: development of 3 methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1-2, p. 519-526, Dec., 2014.

PINTO, G. M.; FILIPE, P. Normas de boa prática para o tratamento da psoríase em placas em idade não pediátrica com biológicos. **Revista da SPDV.**, v. 69, n. 4, p. 531-553, 2011.

PRASAD, R.; ANAND, S.; KOUL, V. Biophysical assessment of DC iontophoresis and current density on transdermal permeation of methotrexate. **Int. J. Pharm. Investig.**, v. 1, n. 4, Oct., 2011.

PRASAD, R.; KOUL, V. Transdermal delivery of methotrexate: past, present and future prospects. **Ther. Deliv.**, v. 3, n. 3, p. 315-325, 2013.

PRINZ, J. C. Autoimmune aspects of psoriasis: Heritability and autoantigens. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 9, p. 970–979, Sept., 2017.

PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS. 2019. **Portaria Conjunta N° 10, de 06 de Setembro de 2019**. Brasília, 6 dez. 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/Portaria-Conjunta-PCDT-Psor--ase-2019.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.

PSORÍASE – AVALIANDO O TRATAMENTO. 2019. Disponível em: <http://saude.novartis.com.br/psoriase/avaliando-o-tratamento-entenda-o-que-e-pasi-e-dlqi/>. Acesso em: 08 mai. 2019.

PSORÍASE – ENTENDA SEUS VÁRIOS ASPECTOS. 2019. Disponível em: <http://www.uauance.com.br/psoriase-entenda-seus-varios-aspectos>. Acesso em 11 mai. 2019.

PSORÍASE. 2019. Disponível em: <https://www.esteticas.com.br/psoriase.htm>. Acesso em: 01 maio, 2019.

QU, X. *et al.* Determination of serum concentration of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia by HPLC and application practice research. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, v. 8, p. 176-178, 2015.

RAFEIRO, D. F. B. **Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica**. 2013. 44f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Lisboa, 2013.

RAJITHA P.; SABITHA, M. Anti-psoriatic and toxicity evaluation of methotrexate loaded chitin nanogel in imiquimod induced mice model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 110, p. 245-258, Apr., 2018.

RAUT, A. S.; PRABHU, R. H.; PATRAVALE, V. B. Psoriasis clinical implications and treatment: a review. **Crit. Ver. Ther. Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 3, p. 183–216, 2013.

RAVENEL, N. Pemulen. **WAAC Newsletter**, v. 32, n. 3, 2010. Disponível em: <https://cool.culturalheritage.org/waac/wn/wn32/wn32-3/wn32-304.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.

RESEARCHGATE GMBH, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Estrutura-quimica-da-quitosana-Spin-Neto-2008_fig3_257363638. Acesso em: 18 julho 2020.

RESEARCHGATE GMBH, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-HPMC-62-The-Hydroxypropyl-methyl-cellulose-is-divided-in-two-regions-one_fig3_331298687. Acesso em: 18 julho 2020.

RESEARCHGATE GMBH, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-A-lamellar-B-hexagonal-and-C-cubic-liquid-crystal_fig9_322173866. Acesso em: 31 julho 2020.

REXTOP 1% GEL, 2020. Disponível em: <https://www.1mg.com/drugs/rextop-1-gel-403307>. Acesso em: 18 ago. 2020.

RODRIGUES, J. P. F. *et al.* *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43-52, 2017.

RONHOLT, K; IVERSEN. L. Review old and new biological therapies for psoriasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 11, 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.

SABIQA, H. *et al.* Efficacy of methotrexate in patients with plaque type psoriasis. **Pak J Med Sci.**, v. 30, n.5, p. 1050–1053, Sept./Oct., 2014.

SANTOS, A.M. *et al.* Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, p. 330–338, 2017.

SANTOS, E. C. *et al.* Modulation of oxidative and inflammatory cardiac response by nonselective 1- and 2-cyclooxygenase inhibitor and benznidazole in mice. **J Pharm Pharmacol.**, v. 67, n. 11, p. 1556-1566, 2015.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 1. ed. São Paulo: Artliber Editora LTDA, 2006. 240p.

SCHWARTZBERG, L. S.; NAVARI, R. M. Safety of polysorbate 80 in the oncology setting. **Adv Ther.**, v. 35, p. 754–767, 2018.

SHIMADZU, 2020. Disponível em: http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/hplc/lc-20a_prominence.shtml. Acesso em: 20 ago., 2020.

SILVA J. A. *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SILVA, H. R. *et al.* Surfactant-based transdermal system for fluconazole skin delivery. **J. Nanomed. Nanotechnol.**, v. 5, n. 5, 2014.

SILVA, I. C. M. **Prostaglandinas: Metabolismo, Funções e Terapêutica**. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica Do Tecido Animal, no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2005.

SILVA, S. A. M. *et al.* Gallic acid-loaded gel formulation combats skin oxidative stress: development, characterization and *ex vivo* biological assays. **Polymers**, v. 9, p. 391, 2017.

SOARES, M. *et al.* Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 36, n. 3, p. 337-348, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. 2020. Disponível em: https://www.biosanas.com.br/uploads/outros/artigos_cientificos/152/770a01deea02365ae98071043abd3f12.pdf. Acesso em: 01 mar., 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Psoríase. 2009. Disponível em: http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340065482Arquivos_Pdfs_Capitulo5.pdf. Acesso em: 03 fev. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Psoríase. 2017. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/doencas/psoriase/>. Acesso em 10 nov. 2017.

SOM, I. *et al.* Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. **J. Pharm. Bioallied. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 2-9, Jan./Mar., 2012.

SPONCHIADO, G. **Avaliação da eficácia e segurança do extrato da *malva sylvestris* com potencial atividade para tratamento de disfunções da pele.** 2015. 119f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2015.

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

SUKHOV, A., ADAMOPOULOS, I. E., MAVERAKIS, E. Interactions of the immune system with skin and bone tissue in psoriatic arthritis: A Comprehensive Review. **Clinical Reviews Allergy and Immunology**, v. 51, n. 1, p. 887-991, 2016.

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.

TANGSO, K.J. *et al.* Formation of liquid-crystalline structures in the bile salt-chitosan system and triggered release from lamellar phase bile salt-chitosan capsules. **ACS Appl. Mater. Interfaces.**, v. 6, n. 15, p. 12363-12371, Aug., 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2020. Disponível em: <https://www.fishersci.be/shop/products/polysorbate-80-multi-compendial-n-f-j-t-baker-1/10554683/en>. Acesso em 18 julho 2020.

TREXJOX, 2020. Disponível em: <https://www.1mg.com/drugs/trexjoy-gel-489426>. Acesso em 10 ago., 2020.

TRIVIA, A. L. **Análise Do Efeito De Quimioterápicos Em *Chrysomya Megacephala* (Diptera: Calliphoridae)** 2017. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

VICENTINI, C. *et al.* Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16-24, 2013.

VON ZUBEN, E. S. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para aplicação tópica de metotrexato: estudos de liberação, retenção e permeação *in vitro*.** 2012. 159f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências

Farmacêuticas – campus de Araraquara. Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Araraquara, 2012.

WANG, X. *et al.* Microbubbles coupled to methotrexate-loaded liposomes for ultrasound-mediated delivery of methotrexate across the blood–brain barrier. **Int J Nanomedicine**, v. 9: p. 4899–4909, 2014.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, n. 5, p. 603-618, Mar., 2004.

WONGLERTNIRANT, N. *et al.* Evaluation of the Mechanism of Skin Enhancing Surfactants on the Biomembrane of Shed Snake Skin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 523-531, Apr., 2012.

WU, H. Improvement of content determination method of methotrexate for injection by HPLC. **China Pharmacy**, v.0, n. 25, 2007.

YAMADA, K. *et al.* Preparations and Evaluation of Liquid-Crystal Formulations with Skin-permeation-enhancing Abilities for Entrapped Drugs. **J. Oleo.Sci.**, v. 60, n. 1, p. 31-40, 2011.

YANG, F. *et al.* Transdermal delivery of the anti-rheumatic agent methotrexate using a solid-in-oil nanocarrier. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 82, p. 158–163, 2012.

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

YUAN, Y. *et al.* Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1-2, p. 117–123, Sept., 2006.

ZEB, A. *et al.* Improved skin permeation of methotrexate via nanosized ultradeformable liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3813-3824, Aug., 2016.

ZHU, J. *et al.* Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 578, p. 119-127, 2020.