



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

DANIEL AUGUSTO GOMES MIRANDA

Sistema nanoestruturado para a localização cutânea de compostos doadores de H₂S visando o tratamento de psoríase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

DANIEL AUGUSTO GOMES MIRANDA

Sistema nanoestruturado para a localização cutânea de compostos doadores de H₂S visando o tratamento de psoríase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

Co-orientadora: Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa

Versão original.

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Miranda, Daniel Augusto Gomes

Sistema nanoestruturado para a localização cutânea de compostos doadores de H₂S visando o tratamento de psoríase / Daniel Augusto Gomes Miranda; orientadora Luciana Biagini Lopes; coorientadora Soraia Katia Pereira Costa. -- São Paulo, 2019.

94 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sistema nanoestruturado. 2. Pró-fármaco. 3. Co-localização. 4. Doador H₂S. 5. Fase lamelar. I. Lopes, Luciana Biagini, orientador. II. Costa, Soraia Katia Pereira, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel Augusto Gomes Miranda

Título da Dissertação: Sistema nanoestruturado para a localização cutânea de compostos doadores de H₂S visando o tratamento de psoríase

Orientador: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**BIODISPONIBILIZAÇÃO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO EM NANOFORMULAÇÃO TÓPICA E SUA EFICÁCIA NA PSORÍASE EXPERIMENTAL**", registrado sob o protocolo nº **67/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **25/07/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Soraia Kátia Pereira Costa**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Gabriel Luciano Gomes (Treinamento Técnico), Leandro Rodrigues (Pós-Graduando), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Pós-Graduando), Antonio Soares Garcia Jr (Técnico de Laboratório), Daniel Augusto Gomes Miranda (Pós-Graduando), Luciana Biagini Lopes (Pesquisador Colaborador), Marcelo Nicolas Muscará (Pesquisador Colaborador), Karla Barroso Feitosa (Pós-Graduando), Charliston Cunha Alves (Iniciação Científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceug. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**BIOAVAILABILITY OF HYDROGEN SULFIDE IN A TOPICAL NANOFORMULATION AND ITS EFFICACY IN EXPERIMENTAL PSORIASIS**", protocol nº **67/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **7/25/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

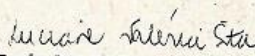
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Soraia Kátia Pereira Costa**

- Team members: *Gabriel Luciano Gomes (Technical Trainee), Leandro Rodrigues (Graduate Student), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Graduate Student), Antonio Soares Garcia Jr (Laboratory Technician), Daniel Augusto Gomes Miranda (Graduate Student), Luciana Biagini Lopes (Colaborator Researcher), Marcelo Nicolas Muscará (Colaborator Researcher), Karla Barroso Feitosa (Graduate Student), Charliston Cunha Alves (Undergraduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c albino</i>	<i>Macho/male</i>	<i>6-7 semanas/weeks</i>	250
	<i>Samp8 mutante</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>1-12 meses/months</i>	141
	<i>SamR mutante</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>1-12 meses/months</i>	135

São Paulo, 01 de agosto de 2017.


Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, minha companheira em todos os momentos, sempre disposta a ajudar no que era possível.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Pela ajuda em diversos momentos durante o mestrado, me fazendo amadurecer na minha caminhada acadêmica.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório Daniela Veronesi, Vanessa Carvalho, Giovanna Salata, Sandra Fernandes, Gabriela Mojeiko, Jenyfer Matos, Julia Passos, por sempre estarem dispostas a ajudar e ensinar.

Ao Moacir Brito pelos ensinamentos na CLAE.

Aos colegas do laboratório da minha co-orientadora, Gabriel Luciano, Anderson Romério, Sylvia Sanches, Karla Feitosa, Antônio Soares, Simone Teixeira que muito me ajudaram nos protocolos com camundongos.

Agradeço a FAPESP pelo incentivo financeiro.

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

RESUMO

MIRANDA, D A G. Sistema nanoestruturado para a localização cutânea de compostos doadores de H₂S visando o tratamento de psoríase. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, que se apresenta de diversas formas e impacta a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento é feito conforme a gravidade da doença; no caso da doença leve a moderada, o tratamento geralmente é tópico utilizando corticoide. Entretanto, esse tratamento apresenta diversos efeitos adversos, principalmente em decorrência dos efeitos sistêmicos dos corticoides. Aqui propomos a associação de corticoides a doadores de H₂S na forma de um novo pró-fármaco (dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT), a fim de potencializar o efeitos anti-inflamatórios sem a necessidade de aumentar a dose aplicada do corticoide, de modo a restringir efeitos adversos. Desenvolvemos 2 grupos de formulações variando o tensoativo e a fase oleosa. Em ambos os grupos, o tipo de fase formada foi dependente do teor de água: sistemas contendo 20 e 70% de água formaram fase lamelar e dispersão estabilizada por fase lamelar, respectivamente. As dispersões apresentaram duas populações com diâmetro variando até 1000 nm e potencial zeta negativo. Todas as formulações apresentaram comportamento reológico do tipo pseudoplástico. A força necessária para destacar as formulações A e B contendo 20% de água da pele foi 1,5-1,9 vezes superior comparado à água, indicando potencial bioadesivo das formulações. A dexta-TBZ foi incorporada a 1%, e sua estabilidade nas formulações foi demonstrada por 8 h, mesmo naquelas contendo 70% de água. As formulações A com 20% (A-20) e 70% (A-70) de água promoveram acantose. As formulações do grupo B promoveram aumento na penetração cutânea do pró-fármaco, sendo a penetração no estrato córneo e epiderme viável 1,9-2,2 vezes (B-20) e 1,7-2,6 vezes (B-70) maior quando comparados ao controle. Selecionamos B-70 para os estudos in vivo em camundongos com psoríase induzida por imiquimode. Os pró-fármacos são eficazes na redução de parâmetros inflamatórios em camundongos com psoríase experimental, mas esses efeitos são semelhantes ao tratamento convencional (dexametasona).

Palavras-chave: Sistema nanoestruturado. Pró-fármaco. Co-localização. Doador H₂S. Fase lamelar.

ABSTRACT

MIRANDA, D A G. Nanoestruturated systems for the cutaneous delivery of H₂S donor compounds for treatment of psoriasis. 2019. 94 p. Dissertation (Masters thesis in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Psoriasis is a chronic inflammatory disease, immune-mediated, that occurs in various forms, causing major psychosocial impact and decreases in the quality of life of patients. Treatment varies according to the severity of the disease; in the case of mild-to-moderate disease, the standard treatment is topical corticosteroids. However, this treatment has several adverse effects, mainly due to the systemic effects of corticosteroids. Here we propose the association of corticosteroids to H₂S donors (dexamethasone-TBZ and dexamethasone-ADT) in the form of a new codrug in order to potentiate the anti-inflammatory effects without the need to increase the applied dose of the corticosteroid, reducing the incidence of adverse effects. We developed two groups of formulations varying the surfactant and the oil phase. In both groups, the type of phase formed was dependent on the water content: systems containing 20 and 70% water formed lamellar phase and dispersion stabilized by lamellar phase, respectively. The dispersions had two populations with a diameter ranging up to 1000 nm and negative zeta potential. All formulations showed pseudoplastic rheological behavior. The dexamethasone-TBZ was incorporated at 1%, and its stability in the formulations was demonstrated for 8 h, even for those containing 70% water. Formulations A with 20% (A-20) and 70% (A-70) of water promoted acanthosis. The formulations of group B increased skin penetration of the codrug, and 1.9-2.2 times (B-20) and 1.7-2.6 times (B-70) more drug was quantified in the stratum corneum and epidermis compared to the control. We selected B-70 for *in vivo* studies in mice with psoriasis induced for imiquimode. The codrugs were effective in reducing inflammatory parameters in mice with experimental psoriasis, but these effects are similar to conventional treatment (dexamethasone).

Keywords: Nanostructured system. Co-drug. Co-localization. Donor H₂S. Lamellar phase.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia da psoríase	14
Figura 2. Molécula híbrida de doador de H ₂ S (TBZ) acoplado à dexametasona	18
Figura 3. Representação esquemática da organização da pele e estruturação da epiderme e estrato córneo	19
Figura 4. Representação das vias de penetração através da pele íntegra	20
Figura 5. Representação das fases líquido-cristalinas comumente empregadas como sistemas de liberação de fármacos	22
Tabela 1. Composição das formulações do grupo A	27
Tabela 2. Composição das formulações do grupo B	28
Figura 6. Esquema do experimento de avaliação do potencial irritativo	34
Figura 7. Molécula híbrida de doador de H ₂ S (ADT) acoplado à dexametasona	36
Tabela 3. Grupos do protocolo de indução de psoríase experimental	37
Figura 8. Esquema ilustrativo do protocolo de indução da psoríase experimental	38
Figura 9. Diagrama de fases	42
Figura 10. Amostras visualizadas sob luz polarizada	42
Figura 11. Diagrama de fases das formulações o grupo B	43
Figura 12. Gráficos da distribuição de tamanho das gotículas das formulações	45
Tabela 4. Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das formulações	46
Tabela 5. Potencial zeta e pH das formulações selecionadas	46
Tabela 6. Índice de comportamento determinado utilizando a lei de potência	47
Figura 13. Comportamento reológico e viscosidadedas formulações estudadas	48
Tabela 7. Parâmetros determinados no teste de bioadesão <i>in vitro</i>	49
Figura 14. Cromatograma representativo de uma curva de calibração demonstrando a variação da área do pico em função da concentração	50
Figura 15. Curva de calibração utilizada na quantificação do pró-fármaco	51
Figura 16. Cromatogramas demonstrando a especificidade do método	52
Figura 17. Concentração do pró-fármaco após incorporado as formulações através do tempo	53
Figura 18. Fotomicrografias das formulações visualizadas sob luz polarizada após incorporação do fármaco	54
Figura 19. Concentração do pró-fármaco após incorporação na mistura de tensoativo e fase oleosa da formulação B-70 ao longo do tempo	55

Figura 20. Cromatograma representativo da concentração do pró-fármaco dexta-TBZ ao longo do tempo	57
Figura 21. Efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica	59
Figura 22. Penetração cutânea do pró-fármaco dexta-TBZ	60
Tabela 8. Percentual de fármaco retido nas camadas da pele	61
Figura 23. Concentração do pró-fármaco na fase receptora através do tempo	62
Figura 24. Efeitos na pele dorsal do camundongo com aplicação da formulação	63
Figura 25. Espessura da epiderme da pele dorsal dos camundongos tratados com as diversas formulações	64
Figura 26. Gráficos da atividade da MPO	65
Figura 27. Efeitos dos diversos tratamentos nos parâmetros inflamatórios	67
Figura 28. Episódios de coceira espontânea em 30 minutos	68
Figura 29. Efeitos na pele dorsal do camundongo com aplicação dos diversos tratamentos	69
Figura 30. Espessura da epiderme da pele dorsal dos camundongos com os diversos tratamentos	70
Figura 31. Gráficos da atividade MPO	71
Figura 32. Efeitos dos diversos tratamentos na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue	72
Figura 33. Efeitos dos diferentes tratamentos na contagem total e diferencial de leucócitos na medula	73
Figura 34. Efeitos dos diferentes tratamentos no baço	74

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
<u>1.1 Tratamento da Psoríase</u>	14
<u>1.2 Biossíntese e doadores de H₂S na inflamação</u>	16
<u>1.3 Aplicação tópica de fármacos e sistemas de liberação</u>	18
<u>1.4 Justificativa do estudo</u>	23
2.0 OBJETIVOS	24
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	24
<u>3.1 Design e desenvolvimento dos nanocarreadores</u>	25
<u>3.2 Caracterização das formulações</u>	28
<u>3.2.1 Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial zeta (do sistema nanodisperso estabilizado por fase líquido-cristalina)</u>	28
<u>3.2.2 Avaliação do comportamento reológico e viscosidade</u>	29
<u>3.2.3 Microscopia de luz polarizada</u>	29
<u>3.3 Avaliação do potencial bioadesivo</u>	29
<u>3.4 Incorporação de fármaco</u>	30
<u>3.5 Estabilidade do pró-fármaco na formulação antes e após incorporação de água</u>	30
<u>3.6 Avaliação da formulação sobre a permeabilidade e penetração cutânea da molécula híbrida</u>	31
<u>3.6.1 Obtenção do modelo de pele</u>	31
<u>3.6.2 Avaliação da perda de água transepidérmica</u>	32
<u>3.6.3 Avaliação da penetração cutânea do pró-fármaco</u>	32
<u>3.6.4 Desenvolvimento do método de CLAE</u>	33
<u>3.7 Avaliação da capacidade irritante da formulação na integridade da pele dorsal murina</u>	34
<u>3.8 Avaliação histológica da pele dorsal</u>	35
<u>3.9 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal</u>	35
<u>3.10 Indução da psoríase e delineamento experimental</u>	36
<u>3.10.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios</u>	38
<u>3.10.2 Avaliação do prurido espontâneo</u>	38
<u>3.10.3 Avaliação histológica da pele dorsal</u>	39

<u>3.10.4 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal</u>	39
<u>3.10.5 Quantificação de leucócitos no sangue periférico, medula óssea e análise do baço</u>	39
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5.0 RESULTADOS	41
<u>5.1 Desenvolvimento da formulação</u>	41
<u>5.2 Caracterização das formulações</u>	43
<u>5.2.1 Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial zeta (do sistema nanodisperso estabilizado por fase líquido-cristalina)</u>	43
<u>5.2.2 Avaliação do comportamento reológico e viscosidade</u>	46
<u>5.3 Avaliação do potencial bioadesivo</u>	49
<u>5.4 Padronização do método de CLAE</u>	50
<u>5.5 Incorporação do pró-fármaco e estabilidade nas formulações</u>	52
<u>5.6 Avaliação da formulação sobre a permeabilidade e penetração cutânea do pró-fármaco</u>	58
<u>5.6.1 Avaliação da perda de água transepidérmica</u>	58
<u>5.6.2 Avaliação da penetração cutânea do pró-fármaco</u>	59
<u>5.7 Avaliação da irritação na pele dorsal do camundongo</u>	62
<u>5.8 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal</u>	64
<u>5.9 Indução da psoríase e delineamento experimental</u>	65
<u>5.9.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios</u>	65
<u>5.9.2 Avaliação do prurido espontâneo</u>	68
<u>5.9.3 Avaliação histológica da pele dorsal</u>	68
<u>5.9.4 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) da pele dorsal</u>	70
<u>5.9.5 Quantificação de leucócitos no sangue periférico, medula óssea e análise do baço</u>	71
6.0 DISCUSSÃO	75
7.0 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86

1.0 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada que atinge cerca de 1% da população brasileira e 1 a 3 % da população mundial (Sociedade Brasileira de Dermatologia-SBD, 2012; Parisi et al., 2013; Szepietowski, Reich, 2016). Fatores como idade, sexo, geografia e etnia, influenciam a prevalência da psoríase, sendo as taxas de prevalência maiores em regiões de latitude mais alta, assim como em caucasianos quando comparados a outras etnias. Observou-se que a prevalência em crianças, aproximadamente 0,7% (Kravvas, Gholam, 2018), é menor do que em adultos e acima da média mundial em alguns países do continente europeu, como França (5,2%) e Noruega (8,5% da população afetada), enquanto que países mais próximos da linha do equador, incluindo Egito, China, Taiwan e Sri Lanka, possuem uma baixa prevalência, com cerca de 0,5% da população afetada (Parisi et al., 2013; Naldi, 2013).

A psoríase impacta grandemente a qualidade de vida do paciente, sendo comparável ao comprometimento físico e emocional de outras morbidades crônicas como doenças cardíacas, câncer ou diabetes, e apresenta um índice maior de suicídio, depressão e consumo de álcool (Rapp et al., 2009, SBD, 2012). A doença se apresenta de várias formas, sendo a psoríase vulgar a mais comum, a qual representa de 85 a 90% dos casos, e pelo menos 60 a 90% dos pacientes com a doença apresentam prurido intenso e efeitos inflamatórios na pele (Krueger, Bowcock, 2005; Nestle et al., 2009; SBD, 2012; Szepietowski, Reich, 2016). A psoríase vulgar se caracteriza por formação de placas secas, avermelhadas, com escamas prateadas ou esbranquiçadas e prurido, podendo atingir qualquer parte do corpo (Nestle et al., 2009). Os tratamentos disponíveis podem deixar a pele livre das lesões, mas não promovem a cura (Mrowitez et al., 2011). Nos casos leves a moderados e localizados, que não comprometem a qualidade de vida do paciente, o tratamento de escolha é feito pela via tópica em decorrência da conveniência, segurança e menor custo, com corticosteroides, tacrolimus, calcipotriol, coaltar ou antralina (SBD, 2012; Beyer, Wolverton, 2010).

A etiologia da psoríase não é bem conhecida, mas sabe-se que ela é multifatorial, na qual tanto fatores intrínsecos quanto extrínsecos podem desencadeá-la ou agravá-la, incluindo trauma leve, alguns medicamentos, fumo, obesidade,

estresse, infecções por estreptococos beta-hemolítico e HIV. Com relação aos fatores genéticos, a relação é bem estabelecida, com maior incidência da doença em parentes de primeiro e segundo grau quando comparado a população em geral. Essa relação fica evidente em estudos onde a taxa de concordância entre gêmeo monozigótico é até três vezes maior do que entre gêmeos dizigóticos (Boehncke, 2015; Naldi, 2013; Nestle et al., 2009; Schon, Boehncke, 2005). Além disso, estudos mostram que indivíduos que tem início da psoríase na infância geralmente tem algum familiar que apresenta a doença, enquanto que em pacientes sem histórico familiar da doença, ela normalmente tem início na fase adulta e apresenta-se na forma menos grave (Boehncke, 2015; Naldi, 2013; Nestle et al., 2009; Schon, Boehncke, 2005).

O mecanismo de herança genética da psoríase é complexo; estudos demonstram que ao menos nove *loci* cromossômicos estão ligados à doença, os quais são denominados genes de susceptibilidade “PSORS”. O PSORS 1 é o principal envolvido e considerado fator determinante genético da psoríase, que provavelmente responde por 35 a 50% da hereditariedade e está localizado no cromossomo 6p (Boehncke, 2015; Nestle et al., 2009). Com relação à sua fisiopatologia (**Figura 1**), é observada hiperplasia de células da epiderme, com maturação prematura dos queratinócitos, que se encontram com a taxa mitótica aumentada em comparação com a pele normal, levando a uma queratinização incompleta com retenção de núcleos no estrato córneo (paraqueratose), ocasionando o espessamento da epiderme (acantose). Juntamente com este processo ocorre a proliferação e dilatação de vasos sanguíneos, além do aparecimento de infiltrado inflamatório com células dendríticas, macrófagos, células T e neutrófilos (Nestle et al., 2009; Krueger, Bowcock, 2005).

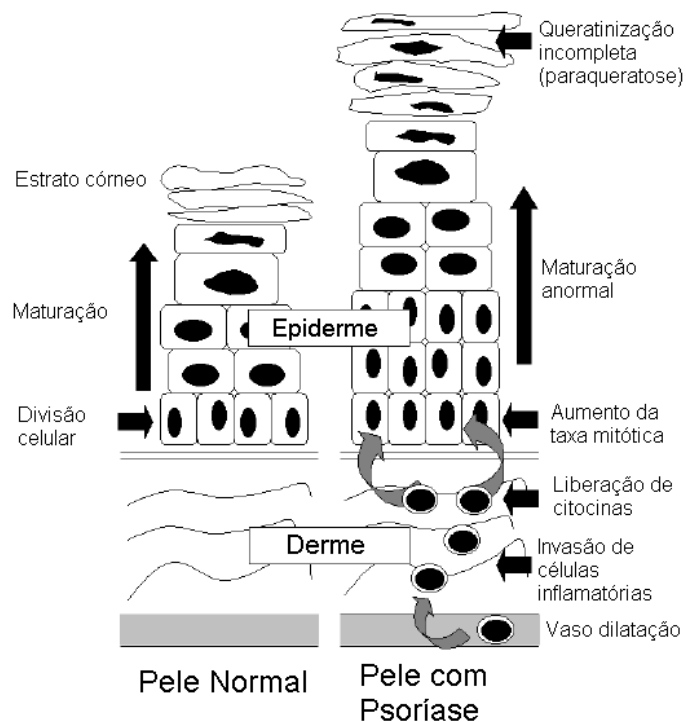


Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia da psoríase. Adaptado de Mason, 2013.

1.1 Tratamento da Psoríase

A terapia da psoríase visa remover a pele escamosa (escamas) e impedir ou limitar a proliferação celular acelerada. Além da terapia farmacológica com agentes tópicos e sistêmicos, existem alternativas não farmacológicas, que podem oferecer alívio, dependendo da gravidade da doença.

Há mais de 30 anos, o conhecimento da fisiopatologia e a participação de fatores genéticos na psoríase eram limitados, sendo a base e o controle da terapia desta doença, o emprego de fármacos, como corticosteroides e imunossupressores, cuja gravidade dos efeitos adversos é bem conhecida (Torsekar, Gautan, 2017; Castela et al., 2012; Lamba, Lebwohl, 2001).

Os corticoides tópicos são os compostos mais usados para tratar a psoríase leve a moderada devido a sua ação anti-inflamatória, antiproliferativa, imunossupressora, vasoconstritora e antipruriginosa. A eficácia varia conforme a forma clínica, formulação e o composto utilizado, variando de 5 a 90% no tratamento de psoríase de placa corporal e de 40 a 90% na psoríase do couro cabeludo. Em vista dos graves efeitos adversos locais e sistêmicos, a utilização tópica de corticoides não

deve exceder 2- 3 semanas para aqueles de alta potência, como o clobetasol e dipropionato de betametasona, quatro semanas para os de média potência, como furoato de mometasona, e três meses para os de baixa potência, como acetato de hidrocortisona (Castela et al., 2012; Lamba, Lebwohl, 2001).

O principal fator que determina a abordagem terapêutica da psoríase é a gravidade da doença, que pode ser classificada em leve, moderada ou grave. Os tratamentos disponíveis podem deixar a pele livre das lesões, mas não promovem a cura (Mrowitez *et al.*, 2011; Schon, Boehncke, 2005). A severidade da doença é classificada conforme a superfície corporal afetada, na leve < 3% da superfície, moderada 3 – 10% e na grave > 10% da superfície (Kim, Jerome, Yeung, 2017). Aproximadamente 70 a 80% dos pacientes podem ser tratados adequadamente somente com o uso de terapia tópica (Schon, Boehncke, 2005), e em casos refratários, pode ser adicionado ao tratamento a fototerapia (Mrowitez *et al.*, 2011). Nos casos leves e localizados, que não comprometem a qualidade de vida do paciente, pode ser usado somente o tratamento tópico, feito com corticosteróides, tacrolimus, calcipotriol, coaltar, antralina ou com o retinóide tazaroteno (Beyer, Wolverton, 2010; Schon, Boehncke, 2005). Nos casos moderados a graves, o tratamento deve ser feito com fototerapia ou fármacos sistêmicos, como metotrexato, ciclosporina, acitretina, adalimumabe, infliximabe; em alguns casos podem ser utilizadas ambas as abordagens (Beyer, Wolverton, 2010; Schon, Boehncke, 2005).

A antralina foi por muitos anos o tratamento mais efetivo para psoríase em placas, devido a sua ação na redução da proliferação de queratinócitos, inibição da ativação de células T e restauração da diferenciação celular (Torsekar, Gautan, 2017). Os análogos da vitamina D, como o calcipotriol, são muito utilizados como adjuvante na psoríase de placa crônica; eles se ligam aos receptores intracelulares da vitamina D e regulam os genes envolvidos na proliferação da epiderme, inflamação e queratinização (Torsekar, Gautan, 2017). O tazaroteno é um derivado da vitamina A utilizado em pacientes que tem psoríase de placa estável, muitas vezes é associado ao calcipotriol, atuando na hiperproliferação da epiderme, normalizando a diferenciação dos queratinócitos e diminuindo a inflamação (Torsekar, Gautan, 2017).

Até o presente momento os corticoides continuam sendo os compostos mais utilizados na terapia tópica e sistêmica da psoríase, pois possuem custo menos elevado do que os agentes biológicos, e efeitos adversos de gravidade equiparada.

Mesmo quando aplicado topicamente, os corticosteroides promovem diversos efeitos adversos locais (ex.: como atrofia da pele, caracterizada pelo afinamento, perda de elasticidade e telangiectasia) e sistêmicos graves, decorrentes da absorção transdérmica destes (ex.: supressão do eixo *Hipotálamo-Pituitária-Adrenal* e síndrome de Cushing) (Castela et al., 2012). Diante desse cenário, ainda se faz necessária a pesquisa por opções terapêuticas para o controle da psoríase, particularmente em casos onde a terapia com corticosteroides não responde eficazmente.

O uso de combinações de fármacos com corticoides representa uma estratégia interessante para potencializar o efeito farmacológico desejado, reduzindo a concentração necessária do corticoide comparado ao seu uso individual. Com isso, infere-se a possibilidade de redução dos efeitos adversos cutâneos, da quantidade de fármaco absorvida através do tecido e da incidência dos efeitos adversos sistêmicos, principalmente no tratamento de manutenção de longo prazo e prevenção de remissões (Lamba, Lebwohl, 2001; Castela et al., 2012b; Devaux et al., 2012). A viabilidade dessa base racional é demonstrada pela utilização da combinação de corticosteroides e análogos da vitamina D para melhoria da segurança e eficácia do tratamento (Lamba, Lebwohl, 2001).

Nesse sentido, estudos recentes mostram que um novo mediador endógeno, sulfeto de hidrogênio (H_2S), participa de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo psoríase (Ashorafa et al., 2012; Li et al., 2011; Lowica, Bettowski, 2007).

1.2 Biossíntese e doadores de H_2S na inflamação

Doadores de H_2S têm despertado interesse no controle da inflamação e nocicepção, diminuindo o infiltrado de leucócitos, edema e o prurido (Li et al., 2011; Lowica, Bettowski, 2007; Cunha et al., 2008; Whiteman et al., 2010; Rodrigues et al., 2017).

O H_2S é um gás gerado pelas células dos mamíferos por duas vias, a enzimática e a não enzimática, sendo a via enzimática a responsável pela maior parte da produção de H_2S (Wang, 2012). Ele é produzido em quantidade significativa em diversos tecidos, sendo as maiores taxas de produção encontradas no cérebro, sistema cardiovascular, fígado e rins (Lowica, Bettowski, 2007). O principal substrato para a produção de H_2S endógeno pela via enzimática é a L-cisteína, um aminoácido que contém enxofre na sua estrutura e pode gerar o H_2S por diferentes vias, essas

reações são catalisadas pelas enzimas cistationina- β -sintase (CBS) e cistationina- γ -liase (CSE), ambas necessitam da vitamina B6 como co-fator da reação (Wang, 2012; Li et al., 2011; Lowica, Bettowski, 2007). Outra via enzimática para a produção de H₂S que também utiliza L-cisteína como substrato e é catalisada pelas enzimas cisteína aminotransferase (CAT) e a 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (MST) (Wang, 2012; Li et al., 2011; Lowica, Bettowski, 2007).

Estudos anteriores de Costa e colaboradores demonstram que os doadores de H₂S, especificamente a molécula híbrida de ATB-346, reduziu os parâmetros de dor e inflamação causada pela sinovite articular de joelho induzida por carragenina em ratos (Ekundi-Valentim et al., 2013). Outro estudo demonstrou que os doadores de H₂S espontâneos de liberação rápida, Na₂S e reagente de Lawesson, melhoram significativamente o prurido e a inflamação cutânea induzida por histamina e pela degranulação de mastócitos na pele dorsal do camundongo (Rodrigues et al., 2017). Esse grupo demonstrou também que, na psoríase experimental induzida por imiquimode em camundongos, houve redução de alguns sinais clínicos da doença, como eritema, descamação, espessamento epidérmico, prurido espontâneo e do número de leucócitos no sangue periférico e no baço, após tratamento sistêmico com o doador de H₂S de liberação lenta GYY4137, o que demonstra o potencial terapêutico desta molécula, sugerindo que a suplementação de H₂S pode ser uma alternativa ao tratamento da psoríase (Rodrigues et al., 2015).

Outros autores empregando modelos experimentais distintos vêm revelando o potencial anti-inflamatório e anti-nociceptivo de doadores de H₂S (Li et al. 2011; Lowica, Bettowski, 2007; Cunha et al., 2008; Whiteman et al., 2010; Rodrigues et al., 2017). De fato, estudos pré-clínicos (Laboratório Antibe) com moléculas híbridas contendo AINEs (cetoprofeno) e doadores de H₂S vêm sendo realizados com sucesso na terapia da artrite reumatoide, osteoartrite e dor severa (<http://www.antibethera.com/2017/04/26/antibe-therapeutics-advances-development-of-atb-352-in-wake-of-growing-global-opioid-epidemic/>).

Além de AINEs, a associação com corticosteroides também vem sendo proposta. Um estudo realizado por Yun Sun et al. (2015), com células de pulmão *in vitro* de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, sugere que a administração concomitante de doadores de H₂S e dexametasona tem um efeito sinérgico, aumentando o potencial anti-inflamatório do corticoide.

Com base nesses estudos, propomos a administração tópica de uma combinação do corticóide dexametasona com um doador de H₂S (**Figura 2**) como uma nova alternativa aos atuais tratamentos. A molécula híbrida (à qual também nos referiremos como pró-fármaco ao longo do texto) é formada por dois ou mais fármacos, através de uma ligação covalente, obtendo-se uma única molécula. A utilização desta abordagem permite a potencialização do efeito, já que ambos os compostos podem ser co-localizados no mesmo sítio, e o aumento da estabilidade por preservar grupos funcionais lábeis (Das et al., 2004; Thomas et al., 2014).

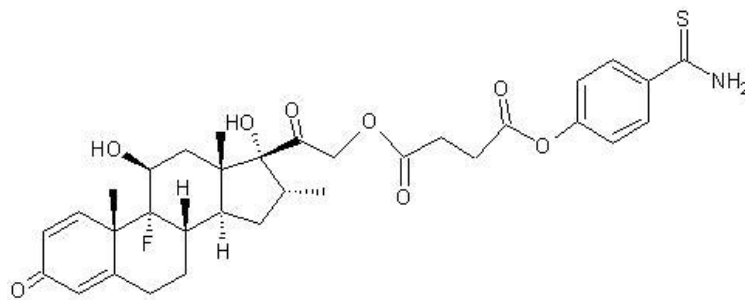


Figura 2. Molécula híbrida de doador de H₂S (TBZ) acoplado à dexametasona.

1.3 Aplicação tópica de fármacos e sistemas de liberação

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso corporal. Sua função primária é de proteção, funcionando como uma barreira entre o meio externo e o meio interno do organismo (Azulay, 2015; Proksch, Bradner, Jensen, 2008).

A pele é estruturalmente composta por duas camadas principais, a epiderme e a derme. A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída basicamente por tecido epitelial estratificado queratinizado, caracterizada por ser avascular e composta por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A derme é uma camada mais interna, formada por tecido conjuntivo, composta por estruturas fibrosas, filamentosas e amorfas, na qual são acomodados vasos, nervos, folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (Moser et al., 2001; Azulay, 2015). Alguns autores consideram a hipoderme como sendo uma terceira camada da pele (Shai, Baran, Maibach, 2009).

O estrato córneo é considerado a principal barreira à penetração de fármacos na pele, o que decorre da sua estrutura altamente organizada e composição. Ele é a camada mais externa da epiderme, que compreende estrutura de células planas, colesterol, ceramidas e ácidos graxos livres, formando um envelope celular de corneócitos, o que gera uma barreira lipídica hidrofóbica, em modelo chamado “tijolos e argamassa”, onde os corneócitos são os tijolos e os lipídeos, a argamassa (Moser et al., 2001; Elias, 1983). Essa estrutura altamente organizada confere alto grau de dificuldade para o transporte de substâncias através da pele. Além disso, o estrato córneo também está envolvido na regulação da libertação de água do organismo para a atmosfera (prevenindo uma grande perda de água para o ambiente), o que é conhecido como perda de água transepidérmica (**Figura 3**). (Moser et al., 2001; Azulay, 2015; Proksch, Bradner, Jensen, 2008).

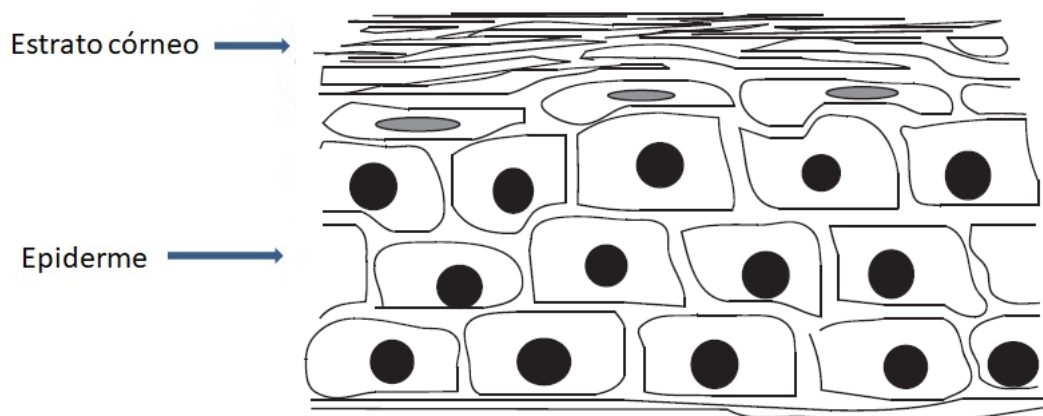


Figura 3. Representação esquemática da organização da pele e estruturação da Epiderme e do Estrato Córneo. Adaptado de Proksch, Bradner, Jensen, 2008.

A penetração cutânea de compostos na pele íntegra pode ocorrer por difusão através da pele ou através dos seus apêndices, como folículo piloso e glândula sudorípara. Entretanto, estes apêndices ocupam apenas 0,1% da superfície da pele humana e por isso, sua contribuição para a penetração é considerada pequena. A difusão através da pele íntegra, por sua vez, pode seguir dois caminhos (**Figura 4**): uma das rotas consiste na difusão através da matriz de lipídeos intercelulares, onde o composto se difunde entre os corneócitos, e a outra é constituída pela via transcelular, na qual o composto atravessa os corneócitos e os lipídeos intervenientes (Moser et al., 2001).

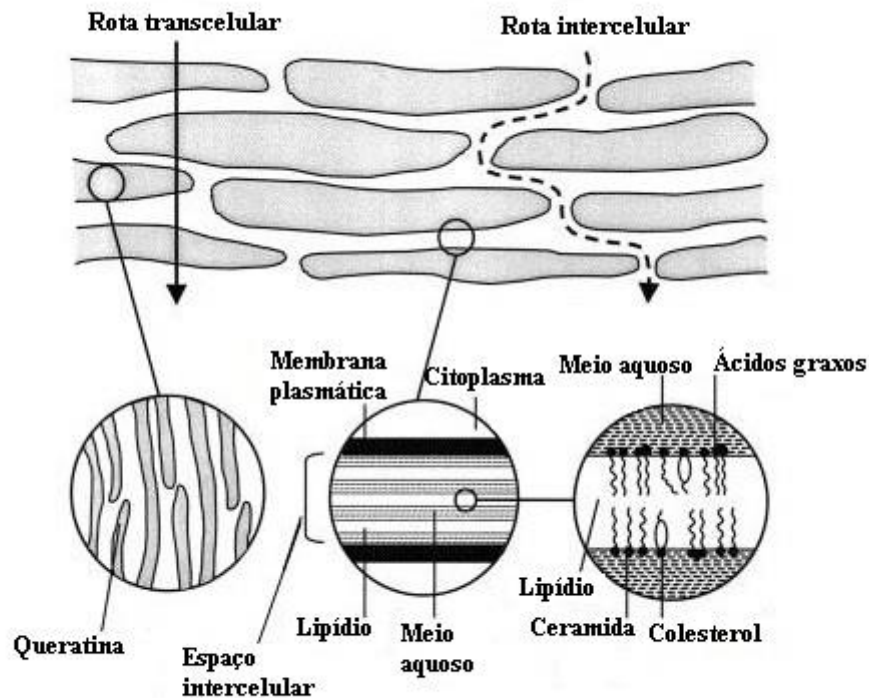


Figura 4. Representação das vias de penetração através da pele íntegra: (i) Atravessando os corneócitos e a matriz lipídica (rota transcelular) e (ii) através da matriz lipídica entre os corneócitos (via intercelular). Adaptado de Moser et al., 2001.

A penetração através do estrato córneo depende grandemente das características físico-químicas do composto. Por exemplo, compostos com massa molecular inferior a 500 g/mol e logP entre 0,5 e 2,5 conseguem ultrapassar essa barreira e atingir camadas viáveis da pele mais eficientemente. No entanto, existe uma grande variedade de compostos farmacologicamente ativos cuja utilização na terapêutica seria de grande interesse, mas que não atendem a esses requisitos, o que explica por que existe um pequeno número de medicamentos disponíveis para aplicação transdérmica a despeito das vantagens relativas à essa via. Com uma massa molecular superior a 600 g/mol e um logP estimado de $4,13 \pm 0,75$, a molécula híbrida que propomos trabalhar é um exemplo. Para possibilitar que esse composto atinja camadas viáveis da pele, é necessário utilizar estratégias de promoção da penetração. Dentre elas, destaca-se o uso de sistemas nanoestruturados.

Diversos sistemas têm sido utilizados para promoção da penetração cutânea, incluindo microemulsões, fases líquido-cristalinas e vesículas lipossomais (Hosmer,

Steiner, Lopes, 2013; Cichewicz et al., 2013; Cevec, Blume, 2004). Considerando que a liberação do H₂S se dá por hidrólise e que tanto o H₂S quanto a dexametasona devam ser co-localizados na pele, a fim de se obter os benefícios da sua associação, a molécula híbrida deve ser estável no nanocarreador. Vale ressaltar que o nosso grupo mostrou aumento da estabilidade de um pró-fármaco lipofílico de vitamina E e ácido lipóico em nanocarreadores mediante a redução do conteúdo aquoso, embora a penetração cutânea tenha aumentado com o conteúdo aquoso do sistema (Thomas et al., 2014).

Com base nesse estudo, idealizamos um nanocarreador que contenha água para maximizar a penetração cutânea da molécula híbrida, mas que possa ser obtido de forma extemporânea ou permitir a incorporação do composto após o sistema ter sido formado e imediatamente antes da aplicação, a fim de assegurar a estabilidade da molécula. Propomos a comparação de um sistema nanoemulsionado, onde as nanogotículas sejam estabilizadas por fase líquido-cristalina, e de um gel de fase lamelar. Com isso, visamos nos beneficiar do potencial promotor de absorção das nanogotículas e da fase líquido-cristalina, bem como aumento da estabilidade da nanoemulsão e da capacidade de controle da liberação da molécula híbrida conferidos pelo sistema líquido-cristalino (dos Santos, da Rocha-Filho, 2007; Kudla et al., 2010).

Os sistemas nanoemulsionados são obtidos pela mistura de óleo, água e tensoativo, dependendo das proporções de cada componente. Sabe-se que essa mistura é capaz de formar sistemas do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), onde a fase interna é composta por gotículas na ordem de nanômetros (Kreilgaard, 2002; Formariz et al., 2005). A nanoemulsão é uma dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis, caracterizada por ser termodinamicamente instável e por possuir a fase interna compostas por gotículas geralmente até 300 nm, embora sistemas com fase interna de até 500 nm tenham sido descritos (McClements, 2012; Kong, Park, 2011; Porras et al., 2004).

Ainda, dependendo do tipo de tensoativo estrutural (ou composto formador da estrutura, geralmente um lipídio polar ou tensoativo), seu fator de empacotamento (P, razão entre volume da cauda hidrofóbica e área da cabeça polar multiplicada pelo tamanho da cauda), temperatura e teor de água, fases líquido-cristalinas podem também ser formadas. As mais comumente utilizadas para liberação de fármacos são as fases lamelar, hexagonal e cúbica (**Figura 5**).

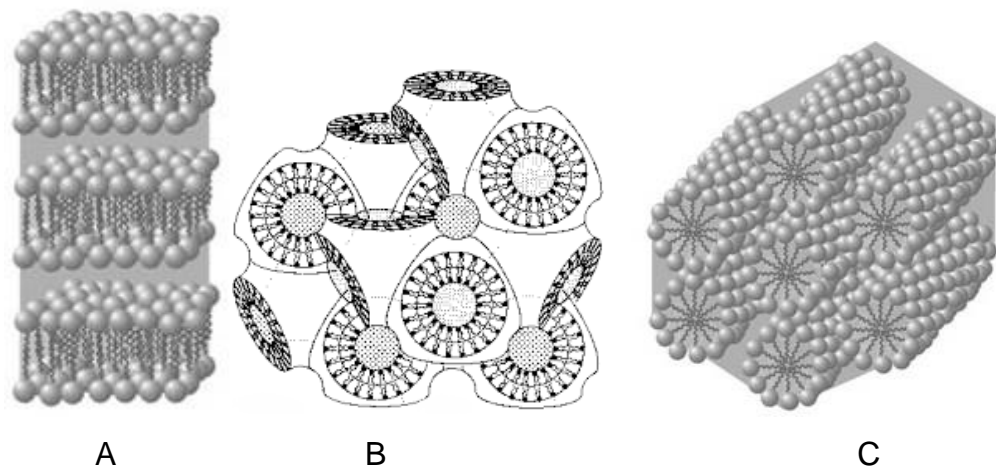


Figura 5. Representação das fases líquido-cristalinos comumente empregadas como sistemas de liberação de fármacos. A- Fase lamelar, B- Fase cúbica e C- Fase hexagonal. Adaptado de Blunk et al., 2006.

A fase lamelar é formada por bicamadas planas de tensoativo separadas por camada intermediária de solvente, geralmente água, e dispostas paralelamente uma a outra, formando uma rede unidimensional (**Figura 5A**) (Formariz et al., 2005; Ezrahi et al., 1999). As fases cúbicas liotrópicas têm estruturas mais complicadas e difíceis de serem visualizadas do que outras fases. A fase cúbica é dividida em duas classes distintas, a fase cúbica bicontínua (**Figura 5B**), na qual uma única bicamada de tensoativo divide o espaço entre duas redes de água interligadas, e a fase cúbica micelar, que consiste em agregados micelares dispostos em retículos cúbicos (Ezrahi et al., 1999). A fase hexagonal consiste em cilindros de micelas resultantes da auto-agregação de um composto estrutural organizadas como um hexágono (**Figura 5C**), cujo diâmetro dos cilindros é geralmente na ordem de 30-50 Å (Muller-Goymann, 2004; Drummond, Fong, 2000). As fases líquido-cristalinas servem como nanocarreadores devido à estrutura composta por regiões aquosas e lipídicas distintas, tendo potencial de incorporar fármacos com propriedades físico-químicas diferentes, tanto lipofílicas quanto hidrofílicas, proporcionando um reservatório de fármaco com liberação sustentada (Dong et al., 2012; Tangso et al., 2014).

Propomos avaliar sistemas em que o tensoativo estrutural seja a fosfatidilcolina, um fosfolípido derivado da soja, que tem tendência a formar cristais líquidos (Simões et al., 2005; Damasceno et al., 2011). Como mencionado, o sistema nanoemulsionado estabilizado por fase líquido-cristalina será comparado com a fase líquido-cristalina do tipo lamelar (Hosmer, Steiner, Lopes, 2013). Essas formulações

foram selecionadas pois, embora o aumento na proporção de fase aquosa de nanocarreadores geralmente resulte em aumento da penetração de compostos lipofílicos (como a molécula híbrida em questão) e redução do potencial irritativo, a estabilidade de pró-fármacos diminui (Pepe et al., 2013; Carvalho et al., 2016; Thomas et al., 2014). Assim, visamos comparar o efeito do teor aquoso e do tipo de sistema formado sobre o potencial irritativo, efeito promotor e estabilidade do pró-fármaco.

1.4 Justificativa do estudo

Considerando os diversos efeitos adversos locais e sistêmicos decorrentes da utilização de corticosteróides, que incluem atrofia e risco de supressão do eixo *Hipotálamo-Pituitária-Adrenal* (Castela et al, 2012), o uso de combinações de outros compostos ativos com corticoides representa uma estratégia interessante para potencializar o efeito farmacológico desejado, reduzindo a concentração necessária do corticoide comparado ao seu uso individual, de modo a reduzir a dose utilizada, a concentração absorvida através da pele e a incidência de efeitos adversos sistêmicos (Kircik, Zografos, 2015). A viabilidade dessa base racional é demonstrada pela utilização da combinação de corticosteroides e análogos da vitamina D para melhoria da segurança e eficácia do tratamento (Lamba, Lebwohl, 2001).

Propomos aqui a administração cutânea de uma molécula híbrida, pró-fármaco formado pela combinação de dexametasona com doador de H₂S. A utilização de doadores de H₂S no controle da inflamação vem ganhando destaque com diversos estudos, inclusive do grupo de Costa e colaboradores, que demonstram diminuição do infiltrado de leucócitos, edema e prurido (Li et al 2011; Lowica, Bettowski, 2007; Cunha et al, 2008; Whiteman et al, 2010; Rodrigues et al, 2017). Diante do pressuposto, propomos aqui maximizar o efeito terapêutico desejado da molécula sem a necessidade de aumentar (sendo possível talvez até mesmo reduzir) a dose de corticoide, de modo a minimizar os efeitos adversos locais e sistêmicos associados ao composto. Consideramos tal estratégia importante, pois poderá beneficiar pacientes com psoríase e outras doenças atópicas de pele. Considerando a função barreira da pele, proporcionada principalmente pela estrutura altamente organizada do estrato córneo, propomos a encapsulação do composto ativo em um sistema nanoestruturado que permita a entrega eficiente e aumento da biodisponibilidade cutânea do composto ativo.

2.0 OBJETIVOS

Objetivo Geral: desenvolver, caracterizar e avaliar sistemas nanoestruturados para encapsulação da molécula híbrida formada por um composto doador de H₂S acoplado ao antiinflamatório esteroide dexametasona.

Objetivos específicos:

- 1- Desenvolver e caracterizar formulações capazes de incorporar a molécula híbrida doadora de H₂S.
- 2- Avaliar a capacidade da formulação de modular a permeabilidade da pele *naive* e promover a penetração e localização cutânea do composto.
- 3- Avaliar a eficácia da formulação selecionada contendo a molécula híbrida em modelo de psoríase experimental induzida por imiquimode em camundongos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes, matérias-primas e solventes utilizados foram:

Acetonitrila (J T Baker)

Ácido oleico (Synth, São Paulo)

Etanol (Synth, São Paulo)

Fitosfingosina (Avanti Polar Lipids, Alabma)

Fosfatidilcolina de soja 95% (Avanti Polar Lipids, Alabma)

Manteiga de karite (Engenharia das essências, São Paulo)

Metanol (Merck, Darmstadt)

Modik® (Germed, São Paulo)

Óleo de girassol (Cargill, São Paulo)

Polisorbato 80 (Synth, São Paulo)

Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich)

Tricaprilina (Abitec Corporation, Janesville)

Neste estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c (6 - 9 semanas de vida) obtidos no biotério de camundongos do departamento de farmacologia do ICB, o projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal (100/2013/CEUA). Estudos de penetração cutânea, perda de água transepidermica e

bioadesão empregando pele de orelha de porco (obtida comercialmente de abatedouro) como modelo de pele são considerados isentos de aprovação por comitê de ética.

3.1 Design e desenvolvimento dos nanocarreadores

Neste estudo, propomos o desenvolvimento de dois grupos de formulações, os quais denominamos A e B, com componentes distintos. No grupo A, o nanocarreador foi desenvolvido a partir da combinação de uma mistura de tensoativos composto por fosfatidilcolina de soja (PC), polisorbato 80 e glicerol (na proporção 2:0,5:0,5 m/m/m, respectivamente); ambos os tensoativos formam fases líquido-cristalinas e nanoemulsões. Essa mistura é interessante do ponto de vista de promoção da absorção, sendo demonstrada a formação de agregados anfipáticos que podem aumentar o transporte na/atraves da pele (Simões et al., 2005). O glicerol, um álcool de cadeia curta, foi utilizado como co-tensoativo na nossa formulação, além de também possuir capacidade de intensificar a penetração cutânea (Williams, Barry, 2012). A fase oleosa selecionada é composta por Tricaprilina e Ácido Oleico (5:1 m/m) e a fase aquosa, por uma solução de poloxamer 407. Enquanto a tricapriline foi selecionada por contribuir com a obtenção de gotículas com tamanho e distribuição homogêneos na faixa nanométrica, o ácido oleico foi adicionado na fase oleosa devido ao seu efeito como promotor de absorção cutânea (Smyth et al., 2002; Kogan, Garti, 2006; Moser et al., 2001). O poloxamer foi utilizado na concentração de 1%; sua inclusão no sistema se deve à sua contribuição para homogeneização e viscosidade do sistema, facilitando sua aplicação tópica (Dumortier et al., 2006).

No grupo B, foram combinados componentes capazes de proteger a barreira cutânea. O nanocarreador foi desenvolvido utilizando como tensoativo a fosfatidilcolina de soja. A fase oleosa selecionada é composta por tricapriline, manteiga de karité, óleo de girassol e fitosfingosina (49,3:15:10:0,7 m/m respectivamente) e a fase aquosa, composta por água. A manteiga de karité é frequentemente utilizada na indústria cosmética; possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Estudo recente sobre dermatite atópica demonstrou que o creme contendo extrato de manteiga de karité tinha a mesma eficácia que o produto precursor de ceramida (Lin, Zhong, Santiago 2017; Hon et al., 2015; Verna et al., 2012; Maranz, Wiesman, 2004). O óleo de girassol consiste principalmente em ácidos oleico

e linoleico, sendo uma opção interessante para uso dermatológico, devido a sua capacidade de preservar a integridade do estrato córneo e melhorar a hidratação, promovendo a homeostase da barreira da pele, sem induzir eritema (Lin, Zhong, Santiago 2017; Danby et al., 2013). A fitoesfingosina é uma ceramida de cadeia longa, composta por uma combinação de um ácido graxo com uma base do tipo esfingosina (4-Hidroxisfingamina) (Stewart, Downing, 1999). As ceramidas de cadeia longa fazem parte da estrutura lipídica do estrato córneo e parecem ser essenciais para a preservação da homeostase da função barreira da pele (Skolova et al., 2017). A redução da quantidade das ceramidas pode estar relacionada ao aumento da perda de água transepidermica, e redução do conteúdo cutâneo de ceramidas foi observada em várias doenças dermatológicas como dermatite atópica e psoríase (Skolova et al., 2017).

Metodologia: No grupo A, o nanocarreador foi desenvolvido a partir da combinação de uma mistura de tensoativos composto por fosfatidilcolina de soja (PC), polisorbato 80 e glicerol (na proporção 2:0,5:0.5 m/m/m, respectivamente). A fase oleosa é composta por tricaprilina e ácido oleico (5:1 m/m) e a fase aquosa, por uma solução de poloxamer 407.

A fosfatidilcolina de soja (PC) se apresenta na forma sólida, sendo necessário colocar sob aquecimento para obtermos uma mistura homogênea de tensoativo e fase oleosa. Os componentes da fase oleosa e tensoativo foram pesados e colocados sob aquecimento em banho à temperatura de 80° C (os componentes da formulação atingiram a temperatura de 75° C). A mistura ficou então em repouso por 8-10 h à temperatura ambiente para garantir que todos os componentes estavam dissolvidos e formando um sistema visualmente homogêneo. Como seu resfriamento leva à solidificação, a mistura foi reaquecida à temperatura de 40°C antes da adição da fase aquosa, a qual foi aquecida separadamente à mesma temperatura e vertida sob a mistura de fase oleosa e tensoativos, seguido de agitação em vórtex por 30 s para obtenção dos sistemas.

As fases oleosa e tensoativo da formulação A foram misturados em diversas proporções (8:2-2:8, m/m), a fase aquosa foi adicionada em proporções variando entre 5 e 80%, e um diagrama de fases foi obtido, no qual relação entre composição e fase formada pode ser melhor observada. Com base nesse diagrama, definimos duas formulações para prosseguir com os experimentos. Em ambas, tensoativo e fase

oleosa foram misturados na proporção de 6:4 (m/m), enquanto que a fase aquosa foi adicionada à 20 ou 70%, resultando em sistemas diferentes: fase lamelar e dispersão de gotículas manométricas foram obtidas com 20% e 70% de uma solução aquosa (com poloxamer 407, 1 %), respectivamente.

Após testes preliminares de irritação em um projeto paralelo, fizemos uma pequena alteração na formulação A, onde utilizamos apenas PC como tensoativo, e após adição de diversas proporções de água, selecionamos a formulação obtida mediante adição de 20% de uma solução de poloxamer 407 (1 %), que resultou em um sistema com formação de fase lamelar. Já para obtenção da formulação com 70% de fase aquosa foi necessário manter polisorbato e glicerol como co-tensoativos para obtenção de sistemas visualmente homogêneos.

Com base no diagrama obtido, fizemos novas alterações no tensoativo e fase oleosa para obter o grupo B de formulações. Duas formulações foram selecionadas; em ambas, tensoativo e fase oleosa foram misturados na proporção de 6:4 (m/m), enquanto que a fase aquosa foi adicionada à 20 ou 70%; fase lamelar e dispersão de gotículas manométricas foram obtidas com 20% e 70% de água, respectivamente. Essas formulações foram selecionadas pois, embora o aumento na proporção de fase aquosa de nanocarreadores geralmente resulte em aumento da penetração de compostos lipofílicos (como o pró-fármaco em questão) e redução do potencial irritativo, a estabilidade de pró-fármacos diminui (Pepe et al., 2013; Carvalho et al., 2016; Thomas et al., 2014). Assim, visamos comparar o efeito do teor aquoso e do tipo de sistema formado sobre o potencial irritativo, efeito promotor e estabilidade do pró-fármaco. As Tabelas 1 e 2 mostram a composição das formulações selecionadas.

Tabela 1. Composição das formulações do grupo A.

GRUPO A	componentes	Concentração (%)
<i>Nanoemulsão (A-70)</i>	<i>PC:polisorbato:glicerol (2:0,5:0.5 m/m/m)</i>	18
	tricaprilina:ácido oleico (5:1 m/m)	12
	solução de poloxamer 407 1%	70
<i>Fase lamelar (A-20)</i>	<i>PC</i>	48
	tricaprilina:ácido oleico (5:1 m/m)	32
	solução de poloxamer 407 1%	20

Tabela 2. Composição das formulações do grupo B.

GRUPO B	componentes	Concentração (%)
<i>Nanoemulsão (B-70)</i>	<i>PC</i>	18
	tricaprilina:manteiga de karité:óleo de girassol: fitosfingosina (49,3:15:10:0,7 m/m)	12
	água	70
<i>Fase lamelar (B-20)</i>	<i>PC</i>	48
	tricaprilina:manteiga de karité:óleo de girassol: fitosfingosina (49,3:15:10:0,7 m/m)	32
	água	20

3.2 Caracterização das formulações

3.2.1 Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial zeta (do sistema nanodisperso estabilizado por fase líquido-cristalina)

Nesse ensaio foi utilizado equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern) para determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das formulações contendo 70% de água. O tamanho da partícula é uma característica importante: sabe-se que partículas nanométricas melhoram a penetração de fármacos através do estrato córneo (Schwarz et al., 1995). O valor do PDI demonstra a homogeneidade da distribuição de tamanho: valores acima de 0,5 geralmente indicam mais de uma população com tamanho distintos e/ou distribuição heterogênea. O potencial zeta indica a carga e fornece informações importantes sobre o grau de repulsão eletrostática entre cargas adjacentes: valores acima de 30 mV (em módulo) são um indicador de estabilidade elétrica, dificultando a agregação (Allam et al., 2015). As formulações A-70 e B-70, que são formadas por gotículas, foram submetidas à análise mediante diluições na proporção 1:2000 e 1:10000 (v/v) em água. As análises foram realizadas imediatamente após a preparação e diluição das formulações.

3.2.2 Avaliação do comportamento reológico e viscosidade

A reologia é o estudo do comportamento deformacional e do fluxo da matéria quando submetido a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas em um intervalo de tempo. De maneira simplificada, o material pode ser classificado como tendo comportamento newtoniano ou não newtoniano (Damasceno et al., 2011). A viscosidade e características reológicas foram determinadas utilizando reômetro do tipo cone-placa (Brookfield) com taxa de cisalhamento de até 500 1/s sob temperatura de 25°C. Selecionamos o modelo de leis de potências (Ikoku, Ramey, 1978) para classificar o comportamento do fluido:

$$\tau = k\dot{\gamma}^n$$

onde τ = tensão de cisalhamento, k = índice de consistência, $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento e n = índice de comportamento do fluido.

Neste modelo, o valor de n indica o tipo de comportamento: $n=1$ é um fluido newtoniano, $n>1$ é um fluido dilatante e $n<1$ é um fluido pseudoplástico (Gabbanelli, Drazer, Koplik, 2005). A análise foi realizada utilizando o software Origin 2018.

3.2.3 Microscopia de luz polarizada

Essa técnica foi utilizada para diferenciar sistemas isotrópicos e anisotrópicos, sendo possível diferenciar microemulsões, nanoemulsões e sistemas líquido cristalinos. A técnica também permite classificar a fase líquido-cristalina conforme a sua isotropia óptica, onde a mesofase lamelar e hexagonal são anisotrópicas e apresentam texturas específicas ao microscópico (Leica Microsystems DM 2500, SP, Brasil) enquanto a cúbica é isotrópica (Formariz et al., 2005).

3.3 Avaliação do potencial bioadesivo

A bioadesão é a capacidade da formulação de aderir a tecidos biológicos, no caso deste projeto, a pele. A vantagem de sistemas bioadesivos como transportadores de fármacos incluem o prolongamento do tempo de permanência no local de absorção, intensificação do contato com a barreira epitelial e diminuição da frequência de aplicação do fármaco o que leva a uma melhor adesão ao tratamento pelo paciente

(Fonseca-Santos et al., 2016). Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Para esse estudo foi utilizada pele de orelha de porco dissecada (certificando-se que a gordura subcutânea foi removida ao máximo) e armazenada a -20°C por até 30 dias. Os pelos foram cortados com tesoura e a pele ligada a extremidade de uma sonda cilíndrica com um anel de borracha. A amostra foi adicionada a suporte imerso em um banho de água a $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A sonda foi baixada a uma velocidade constante de $1\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ até a pele e a amostra serem colocadas em contato, o qual foi mantido por 60 segundos. Subsequentemente, a sonda com a pele foi suspensa a uma velocidade de $0,5\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, e o trabalho de adesão e a força de adesão foram calculados. O processo foi repetido seis vezes (Fonseca-Santos et al., 2016).

3.4 Incorporação de fármaco

O fármaco utilizado neste projeto é lipossolúvel, sendo de difícil solubilização em meio aquoso. Ele foi incorporado na mistura de tensoativo e fase oleosa de cada uma das formulações testadas, a qual foi subsequentemente submetida à sonicação em banho (sonicador modelo Q3350, Quimis) em banho por 4 ciclos de 5 minutos (totalizando 20 minutos em banho de sonicação) sendo em seguida, adicionada a fase aquosa. Formulações contendo a molécula híbrida em concentrações finais variando entre 0,5 e 1% (m/m) foram obtidas.

3.5. Estabilidade do pró-fármaco na formulação antes e após a incorporação de água

Além de ser de difícil solubilização, o composto sofre hidrólise em meio aquoso, e em virtude disso, realizamos um experimento para verificar a estabilidade do fármaco após incorporado nas formulações antes e após adição de água. Alíquotas das formulações prontas, após adição de água, foram retiradas 0, 2, 4 e 8 h após o preparo, diluídas com metanol para obter concentração teórica do pró-fármaco de $50\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Verificamos também a estabilidade do pró-fármaco na mistura de tensoativo e fase oleosa de uma formulação selecionada (B70, selecionada após experimentos de penetração cutânea e potencial irritativo), uma vez que, objetivando uma formulação extemporânea, a água só seria adicionada imediatamente antes da

utilização da formulação. O fármaco foi incorporado na mistura da fase oleosa e tensoativos de B70 em concentração de 0,5 % (m/m). Subsequentemente, alíquotas da formulação foram coletadas 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a preparação, as quais foram diluídas em metanol para obtenção de uma solução de 20 µg/mL.

A quantificação da molécula híbrida foi realizada por CLAE utilizando o método padronizado em nosso laboratório (ver item 3.6.4).

3.6 Avaliação da formulação sobre a permeabilidade e penetração cutânea da molécula híbrida

A capacidade das formulações para melhorar o transporte de agentes terapêuticos na pele pode ser influenciada pelo tipo de formulação, sua composição e concentração de componentes. O ácido oleico, que faz parte da composição da formulação do grupo A deste estudo, é um promotor de penetração cutânea, apresentando a capacidade de extrair ceramidas do tecido queratinizado, aumentando o espaço entre as células, a fluidez lipídica no estrato córneo e a solubilização de compostos lipofílicos (Ogiso, Iwaki, Paku, 1995). Essa desorganização momentânea do estrato córneo facilita a permeabilidade e o transporte do fármaco (Pepe et al., 2012; Lopes, Collett, Bentley, 2005; Lopes, Murphy, Nornoo, 2009; Smyth et al., 2002). Assim, neste experimento, será avaliada a influência da formulação sobre a função barreira da pele e penetração do pró-fármaco a fim de identificarmos mecanismos de promoção da penetração mediada pela formulação.

3.6.1 Obtenção do modelo de pele

Para este modelo utilizamos pele de orelha de porco. Após serem enxaguadas em água corrente, as orelhas foram secas com papel toalha, e foi realizada uma incisão utilizando um bisturi para remover a pele da orelha; subsequentemente foi retirado o excesso de pelos e de gordura da pele com auxílio de tesouras e bisturi. As peles foram envoltas em papel alumínio e armazenadas a -80°C.

3.6.2 Avaliação da perda de água transepidérmica

A fim de estabelecer relações entre o aumento da penetração e alterações na permeabilidade cutânea para que entendamos possíveis mecanismos de promoção da penetração, foi avaliado o efeito da formulação sobre a perda de água transepidérmica, que foi utilizado como um índice da permeabilidade do tecido. Secções de pele de orelha de porco foram montadas em células de difusão e tratadas com as formulações por 8 h. A perda de água transepidérmica foi determinada utilizando evaporímetro (Vapometer, Delfin). Após a pele ser montada na célula de difusão de Franz (com área de 1,77 cm², volume da fase receptora foi de 7 mL, Hanson Research), aguardou-se 15 minutos para estabilização, e se mediu a perda de água transepidérmica; subsequentemente, foram aplicadas as formulações (sem fármaco), ficando em contato com a pele por 8 h. As formulações foram então retiradas cuidadosamente utilizando-se um lenço de papel, montadas novamente na célula de difusão de Franz e após 15 minutos foi medida a perda de água. Óleo de girassol e água foram utilizados como controle. Os resultados foram expressos como a diferença entre a perda de água ao final do tratamento (8 h) e a perda de água da pele antes do tratamento.

3.6.3 Avaliação da penetração cutânea do pró-fármaco

O estudo de penetração *in vitro* foi conduzido utilizando pele de orelha de porco. A pele foi montada em célula de difusão de Franz (1 cm²) com o estrato córneo voltado para o compartimento doador (onde a formulação foi aplicada) e a derme voltada para o compartimento receptor; a fase receptora, que é composta de uma solução de PBS a 20% de etanol, foi mantida em constante agitação e a uma temperatura de 37° ± 0,5° C (Lopes, Collett, Bentley, 2005). A pele foi tratada com 100 mg de formulação com o fármaco na concentração de 1% por 8 h. Subsequentemente a pele foi submetida ao procedimento de “tape stripping” para separação do estrato córneo e camadas viáveis; foram utilizados 14 pedaços de fita, o primeiro pedaço foi descartado, os demais foram colocados em um tubo plástico com 4 mL de metanol. O restante da pele foi cortado em pequenos pedaços e colocados em tubo com 2 mL de metanol. Após esse processo, as amostras foram agitadas no vortex e colocadas no sonicador de banho por 15 min. Em seguida, as amostras do estrato córneo, epiderme

viável e fase receptora foram filtradas em uma membrana PTFE com poro de 0,45 µm e quantificadas (Pepe et al., 2013). Como controle, foram utilizadas soluções do fármaco em óleo de girassol.

Devido as características lipofílicas do pró-fármaco, realizamos um teste de solubilidade na fase receptora. Foram obtidas soluções na fase receptora com concentrações de 20, 30, 40, 50 e 100 µg/mL; a menor concentração que apresentou turvação foi sonicada em banho por 5 minutos (minimizamos o tempo para evitar degradação), filtrada em uma membrana PTFE com poro de 0,45 µm e quantificada por CLAE. Estudamos também a estabilidade do fármaco na fase receptora, e para tal, adicionamos o pró-fármaco para obter concentração de 50 µg/mL. A solução foi colocada na célula de difusão de Franz sob agitação a 37°C, e alíquotas foram retiradas 0, 2, 4 e 8 h após o preparo, filtradas em uma membrana PTFE com poro de 0,45 µm e quantificadas por CLAE.

O fármaco nas camadas da pele (índice de retenção ou localização cutânea) e na fase receptora (índice de permeação transdérmica ou percutânea) foi quantificado por CLAE utilizando um método recentemente padronizado em nosso laboratório (ver item 3.6.4).

3.6.4 Desenvolvimento do método de CLAE

Utilizamos como base o método para quantificação de dexametasona desenvolvida por Español Mariño (2015). No método desenvolvido, a fase móvel é composta de acetonitrila:água (55:45 v/v), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 250 nm, sendo a separação realizada utilizando coluna C18 (Synergi 4µm 150 x 4,6 mm). O equipamento utilizado para análise foi Shimadzu, sendo o degasser (DGU-14A), as bombas (LC-10AD VP), o detector (SPD-10A VP), injetor (SIL-10AD VP) e o forno da coluna (CTO-10AS VP). As concentrações utilizadas para o ensaio de linearidade foram 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL.

3.7 Avaliação da capacidade irritante da formulação na integridade da pele dorsal murina

Os componentes da formulação podem causar irritação, mesmo que a pele esteja íntegra, o que influenciaria a análise dos parâmetros da eficácia no estudo *in vivo* em modelo de psoríase. Para assegurarmos que essa interferência não irá ocorrer, avaliamos o potencial irritativo das formulações *in vivo*.

A fim de assegurar que as formulações são isentas de ações irritantes em pele naive, estas formulações foram testadas *in vivo*. Para isto, a pele dorsal dos camundongos sob anestesia inalatória (oxigênio + isoflurano, 97:3) foi depilada com creme depilatório. Após 72 h, no 1º dia do protocolo (**Figura 6**), os camundongos foram divididos em 3 grupos: controle (vaselina) e dois grupos tratados com a formulação (vaselina e formulação sem princípio ativo; PA), na dose de 65 mg. Os tratamentos foram realizados em dose isolada nos dias 1º ao 4º dia. No 5º dia, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica (isoflurano 5%) e deslocamento cervical. Imediatamente, o material biológico foi coletado dos animais, a saber: pele dorsal e baço e reservadas para os ensaios subsequentes (itens 3.8 e 3.9).

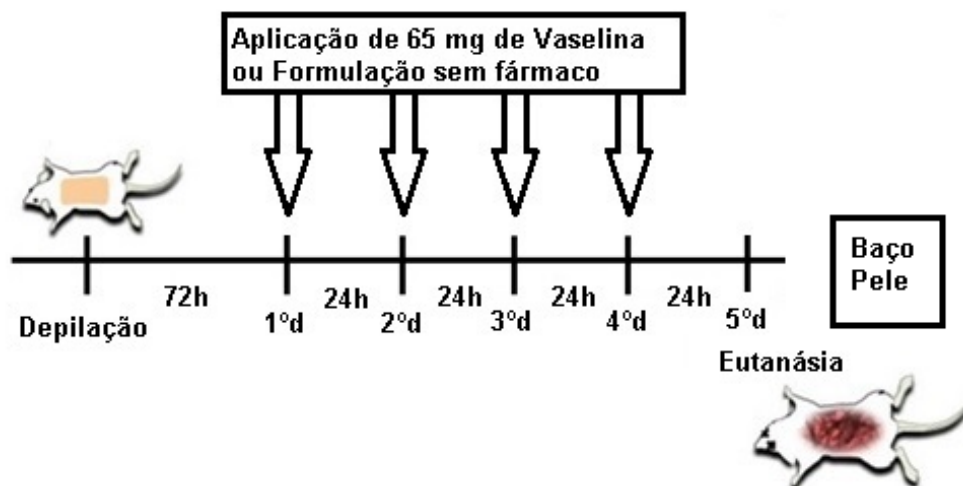


Figura 6. Esquema do experimento de avaliação do potencial irritativo.

3.8 Avaliação histológica da pele dorsal

Mediante anestesia (oxigênio + isoflurano 97:3) e posterior eutanásia dos animais, fragmentos da pele dorsal foram removidos para obtenção de cortes histológicos para avaliação de alterações morfológicas no tecido. Para a preparação dos cortes, o tecido foi fixado em formaldeído (4%) por 24 h, à temperatura de 8° C. A seguir, as amostras foram submetidas às sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III; 40 min) e, então, incluídas em Paraplast®. Espécimes de 5 µm foram obtidos com o auxílio de micrótomo, sendo feitos 3 cortes (separados por uma distância de 10 cortes) em cada lâmina e 3 lâminas para cada camundongo, depois foram montados em lâminas contendo poli-L-lisina. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina & Eosina e montadas para visualização sob microscopia óptica, conforme metodologia padronizada (Ekundin-Valentim et al., 2010). As imagens foram capturadas em microscópio acoplado a um desktop (Leica Microsystems DMC 2500, SP, Brasil) através do programa LAS V4.6 (Leica Microsystems). Foram fotografados 03 campos de cada corte, para a determinação da espessura da epiderme foram realizadas 3 medidas em cada campo através do programa Image Pro Plus (mediaCybernetics Co., MD, USA).

3.9 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal

Fragmentos da pele dorsal de cada animal foram homogeneizados em solução tampão (1 ml/50 mg de pele), contendo o detergente brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB; 50 mg/ml em tampão fosfato de potássio, pH 6,0). Após dois ciclos (45 s/ciclo) de homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4 °C) e aquecidas (60 °C) por 2 h para inativação da catalase endógena. O sobrenadante de cada amostra (10 µl) foi incubado com tampão fosfato de potássio (200 µl; 50 mM; pH 6,0) contendo 0,164 mg/ml de dihidroclorato de odianisidina em H₂O₂ (0,0005 %, pH 6). A reação nas amostras foi analisada via leitura de densidade óptica (DO, 460 nm) em leitor Elisa (Spectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA), e a atividade da MPO nas amostras foi calculada em relação ao peso do tecido (mg), conforme a fórmula: $MPO (U/mg) = V_{max}/s \times 60/0,0113/0,5$, cuja unidade de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um µmol de H₂O₂/min (Schmidt, 2015).

3.10 Indução da psoríase e delineamento experimental

Neste experimento foi avaliada a eficácia da formulação em modelo experimental de psoríase. Este experimento foi realizado com o grupo da Profa. Dra. Soraia K. P. Costa, do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, conforme os métodos padronizados no laboratório (Rodrigues et al, 2015; Rodrigues et al, 2017; Schmidt, 2015).

Todos os experimentos de padronização da formulação e avaliação da penetração cutânea foram realizados com o pró-fármaco dexametasona-TBZ (dexa-TBZ), mas aproveitamos a formulação otimizada para incorporação e avaliação da eficácia de uma outra molécula híbrida, a dexametasona-ADT (dexa-ADT), cuja estrutura é representada na figura abaixo:

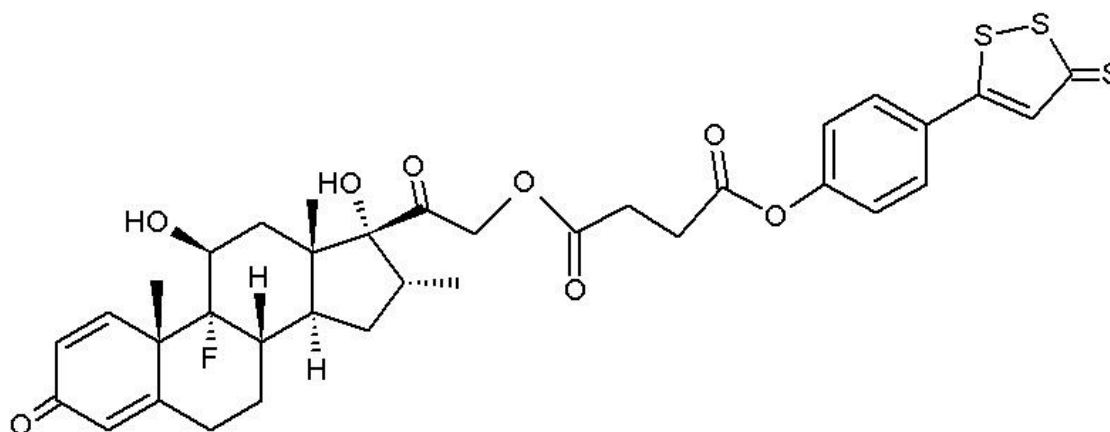


Figura 7. Molécula híbrida de doador de H₂S (ADT) acoplado à dexametasona.

A inclusão desta molécula neste estudo se deu com base em resultados preliminares do grupo da Prof. Soraia Costa, que indicavam que ela poderia ter efeitos mais pronunciados. Assim, os estudos *in vivo* foram realizados para avaliação de B-70 contendo cada uma das moléculas híbridas individualmente.

Para a indução da psoríase experimental (**Figura 8**), primeiramente, o dorso dos camundongos foi depilado e subsequentemente aplicado creme depilatório, sob anestesia inalatória (oxigênio + isoflurano, 97:3). Após 72 h, no primeiro dia do protocolo, os animais foram divididos em 6 grupos (**Tabela 3**), os animais receberam pela manhã uma dose tópica diária (65 mg) de Imiquimode (IMQ) creme 5%, que foi aplicada entre o dorso e orelhas dos camundongos por cinco dias consecutivos,

resultando numa dose diária de 3,25 mg do composto ativo (IMQ). O grupo controle recebeu, de forma similar, o respectivo veículo, vaselina em creme (Schmidt, 2015).

No segundo dia de protocolo, os camundongos dos grupos de tratamento receberam uma única aplicação da formulação, contendo o pró-fármaco (dexametasona acoplada a um doador de H₂S TBZ ou ADT), um doador de H₂S livre de corticóide (ADT) ou dexametasona (em concentração equimolar a do pró-fármaco), enquanto o grupo controle e o grupo psoríase sem tratamento recebeu vaselina. As aplicações de IMQ e os tratamentos foram realizados com um intervalo de 6 horas entre as administrações, a fim de evitar possíveis interações. Esse procedimento foi repetido do 2º ao 5º dia. No 6º dia, os animais serão submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica (isoflurano 5%) e coletamos amostras biológicas (baço, sangue, medula e pele dorsal) para análise (Schmidt, 2015). A concentração de dexametasona foi selecionada com base na dose máxima utilizada por via tópica, enquanto as concentrações de dexta-TBZ, dexta-ADT e ADT foram definidas após os cálculos para serem equimolares a dose de dexametasona.

Tabela 3. Grupos do protocolo de indução de psoríase experimental

GRUPO	Indução	Tratamento	Concentração (%)
Controle	Vaselina	Vaselina	
Psoríase	IMQ	Vaselina	
ADT	IMQ	ADT	0,17
Dexa	IMQ	Dexametasona	0,3
Dexa-ADT	IMQ	Dexametasona-ADT	0,5
Dexa-TBZ	IMQ	Dexametasona-TBZ	0,5

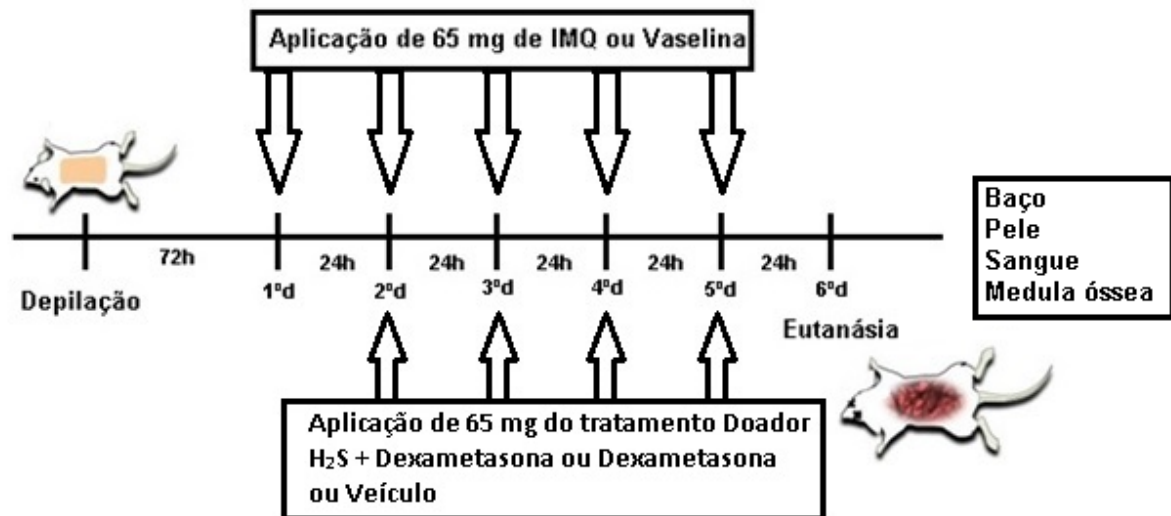


Figura 8. Esquema ilustrativo do protocolo de indução da psoríase experimental.

3.10.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

O índice clínico de severidade foi avaliado pelo grau de inflamação cutânea no dorso dos animais, quantificado via sistema de escore, baseado no Índice Clínico de Área e Severidade da Psoríase (PASI – <http://pasi.corti.il/>). Rubor e descamação foram avaliados independentemente, adotando-se uma escala crescente de 0 – 4, sendo 0 = nenhuma alteração; 1 = leve; 2 = moderado; 3 intenso; 4 = muito intenso.

A análise da acantose foi realizada mediante mensuração da espessura da orelha, medida diariamente antes da aplicação dos agentes teste (em triplicata), com o auxílio de um paquímetro digital (Satarrett 799A) e o resultado foi expresso em milímetros (mm) (Schmidt, 2015).

3.10.2 Avaliação do prurido espontâneo

Os animais ficaram durante 30 min em caixas transparentes de acrílico em sala adequada e adaptada para filmagem. O registro comportamental do prurido espontâneo de cada animal foi realizado por um período de 30 min, via filmagens (filmadora Sony Handycam DCR-PJ6) no 6º dia do protocolo, que corresponde a fase crônica da doença. Foi considerado como comportamento de ataque de coceira, três

ou mais movimentos rápidos da pata traseira do animal sobre a região dorsal onde foi aplicado o IMQ ou vaselina. Os resultados foram expressos como episódios de ataques de coceira no intervalo de 30 min (Schmidt, 2015).

3.10.3 Avaliação histológica da pele dorsal

Realizado conforme descrito no item 3.8.

3.10.4 Mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal.

A mensuração da MPO foi realizada conforme descrito no item 3.9.

3.10.5 Quantificação de leucócitos no sangue periférico, medula óssea e análise do baço.

Sabe-se que a psoríase induzida por IMQ aumenta o número de leucócitos totais no sangue e o número de esplenócitos, podendo causar esplenomegalia (Flutter, Nestle, 2013; Schmidt, 2015), por isso utilizamos este experimento como parâmetro para avaliar a resposta anti-inflamatória da formulação com diversos tratamentos.

Após a eutanásia dos animais, o sangue periférico foi coletado por punção cardíaca, com o auxílio de seringa contendo heparina (5 UI/mL). A contagem do número total de células sanguíneas foi realizada utilizando câmara de Neubauer, enquanto a contagem diferencial foi realizada em esfregaços sanguíneos corados, via método Panótico Rápido de Romanowsky (Interlab, Brasil) (Schmidt, 2015).

O baço dos animais submetidos à eutanásia foi removido e pesado para obtenção do peso total. Uma parte foi seccionada e pesada novamente para analisar o peso do baço seco, que foi colocado em uma estufa por 72 h, o resultado foi expresso pela diferença da perda de peso em percentual. Para a obtenção de células esplênicas, o restante do baço foi macerado em 5 mL de meio asséptico PBS para obtenção do homogenato. Desse homogenato, foi retirado um volume de 10 µL e adicionado ao volume de 190 µL do corante cristal violeta (0,2%) para contagem do número total de células, utilizando a câmara de Neubauer (Schmidt, 2015).

Para a contagem total e diferencial das células da medula óssea (MO), o fêmur esquerdo dos animais foi removido (± 1 cm) e, com o auxílio de uma seringa e agulha (0,80 x 25 cm) contendo 2 mL de PBS heparinizado, foi realizado a inserção desta numa das extremidades do fêmur para injetar PBS. O lavado da MO foi homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur no próprio tubo de coleta e, depois será separado em alíquotas (10 μ L). Cada alíquota foi ressuspensa em 190 μ L da solução de cristal violeta (0,2%) e a quantificação do número total de células nesse homogenato foi feita em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada a partir de lâminas obtidas, via técnica de citocentrífuga (Fanem, Brasil) e coradas com o método Panótico Rápido de Romanowsky (Interlab) (Schmidt, 2015).

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism, ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.0 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento da formulação

Diagrama de fase ternários ou pseudo-ternários são utilizados para demonstrar a relação entre o tipo de fase e a composição. Obtivemos diagramas misturando as fases oleosa, aquosa e tensoativo de formulações do grupo A nas proporções 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7 (m/m) com 10%, 20%, 30%, 50%, 70% e 80% de água. A técnica de microscopia de luz polarizada foi utilizada para diferenciar sistemas isotrópicos, que não desviam ao plano da luz polarizada, e anisotrópicos, que desviam a luz, sendo possível diferenciar microemulsões, nanoemulsões e sistemas líquido cristalinos (Hosmer et al., 2009; Formariz et al., 2005). A técnica também permite diferenciar fases líquido-cristalinas, onde as mesofases lamelar e hexagonal são anisotrópicas e apresentam texturas específicas ao microscópico, enquanto a cúbica é isotrópica (Formariz et al., 2005). Assim, todas as formulações foram caracterizadas macroscopicamente quanto à fluidez, transparência e presença de uma ou múltiplas fases, e esta avaliação foi associada às características microscópicas para classificação.

O diagrama obtido, no qual a relação entre composição e fase formada pode ser observada, está representado na **Figura 9**, enquanto que as estruturas observadas sob microscópio de luz polarizada representando fases encontradas estão representadas na **Figura 10**.

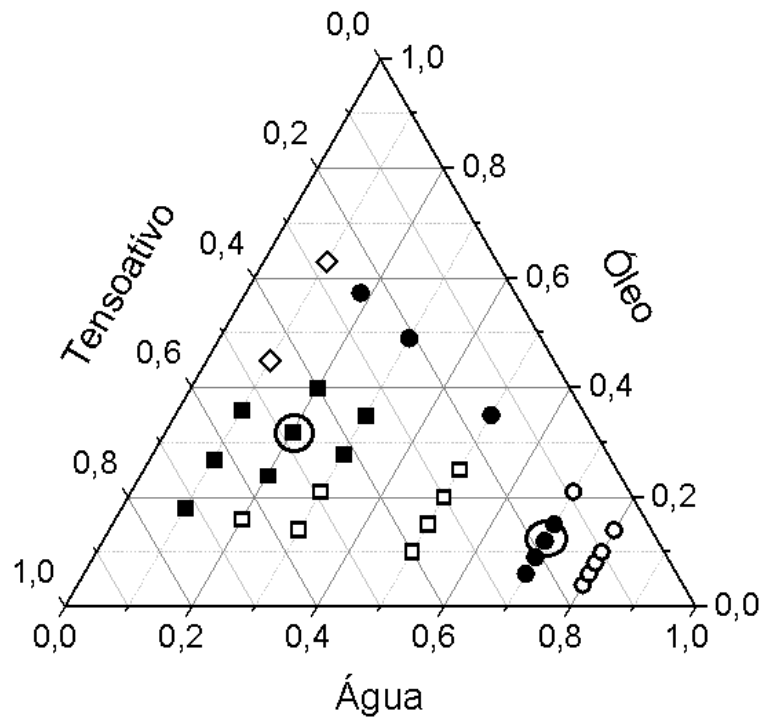


Figura 9. Diagrama de fases, onde ■ fase lamelar, ◇ isotrópica, □ fase de transição, ● gotículas com presença de cruz maltesa e ○ gotículas. As formulações selecionadas estão envolvidas por círculo.

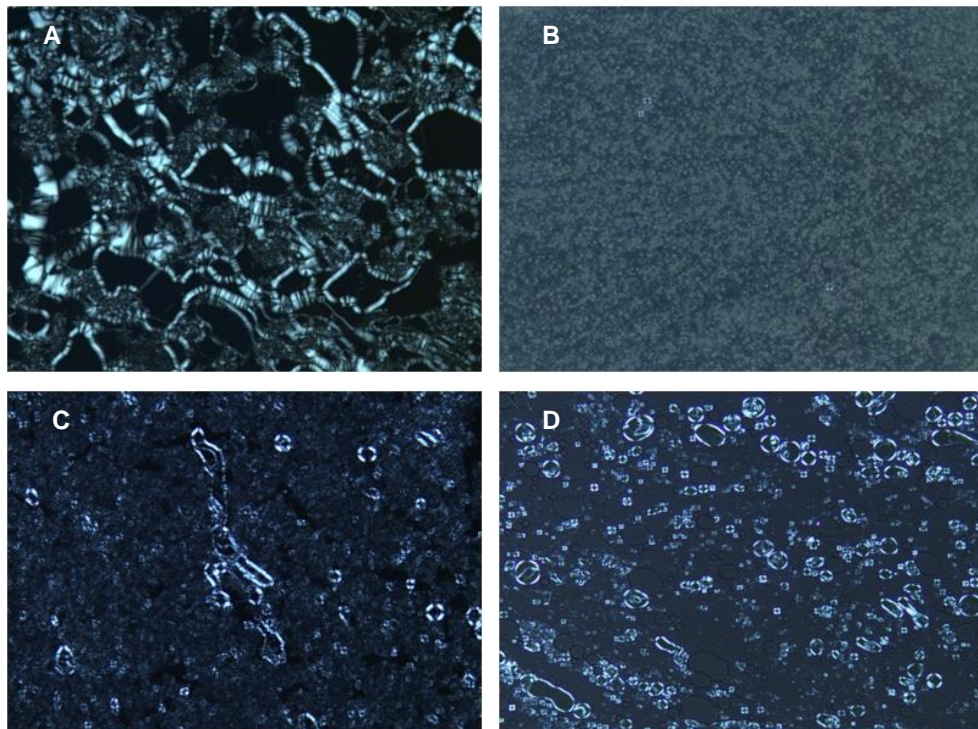


Figura 10. Amostras visualizadas sob luz polarizada. (A) formulação A20, (B) formulação A-70, (C) formulação B-20 e (D) formulação B-70.

Verificamos que com até 30% de água e tensoativo:fase oleosa até 6:4 (m/m) obtivemos a formação de fase lamelar. O aumento na proporção da fase oleosa e adição de 10% de fase aquosa promoveu formação de sistema isotrópico, que pode ser compatível com microemulsão. À medida que a quantidade de água foi aumentada, foi observada alteração na estrutura da formulação: com 70% de água formou-se um sistema com gotículas e presença de cruz maltese, indicando um sistema nanoestruturado estabilizado por fase líquido-cristalina, enquanto que com 80% de água formou-se um sistema composto por gotículas apenas. Com base nesses resultados selecionamos dois sistemas distintos para otimizar e prosseguir:

- tensoativo:fase oleosa na proporção 6:4 (m/m) com 20% de água (que formou uma fase líquido cristalina do tipo lamelar), cuja composição final é tensoativo:fase oleosa:água 48:32:20, m/m/m, e

- tensoativo:fase oleosa na proporção 6:4 (m/m) com 70% de água (que formou um sistema nanoestruturado com gotículas e presença de cruz maltese), cuja composição final é tensoativo:fase oleosa:água 18:12:70, m/m/m.

Ambas as composições estão marcadas com um círculo na **Figura 9**.

A irritação cutânea observada com formulações semelhantes em estudos paralelos nos fizeram considerar alterações na composição, originando as formulações A-20 e as do grupo B. A formulação A-20 foi obtida com apenas fosfatidilcolina como tensoativo e formou fase líquido-cristalina do tipo lamelar. Fotomicrografias representativas das formulações A-20 e A-70 obtidas utilizando luz polarizada estão demonstradas na **Figura 10 A e B**.

Alterando a fase oleosa, obtivemos as formulações do grupo B. Para este grupo, não obtivemos diagramas de fases completos; mantivemos a proporção de tensoativo:fase oleosa de 6:4 (m/m uma vez que ela foi selecionada no grupo A de formulações) e variamos a proporção de água entre 0 e 85% à fim de estabelecer a relação entre o teor aquoso e tipo de fase formada. Um perfil muito semelhante de fases formadas em função do teor de água foi observado se comparado às formulações do grupo A (**Figura 11**), sugerindo que a remoção de polisorbato da mistura tensoativa e a inclusão de manteiga de karitê e ceramidas não impede a formação da fase líquido-cristalina.

Selecionamos as formulações contendo 20 e 70% de água, que formaram uma fase líquido cristalina do tipo lamelar e um sistema nanoestruturado com

gotículas e presença de cruz maltese, respectivamente. Fotomicrografias representativas das formulações B-20 e B-70 obtidas utilizando luz polarizada estão demonstradas na **Figura 10 C e D**. Essas formulações foram selecionadas pois, embora o aumento na proporção de fase aquosa de nanocarreadores geralmente resulte em aumento da penetração de compostos lipofílicos (como o pró-fármaco em questão) e redução do potencial irritativo, a estabilidade de pró-fármacos diminui (Pepe et al., 2013; Carvalho et al., 2016; Thomas et al., 2014). Assim, visamos comparar o efeito do teor aquoso e do tipo de sistema formado sobre o potencial irritativo, efeito promotor e estabilidade do pró-fármaco.

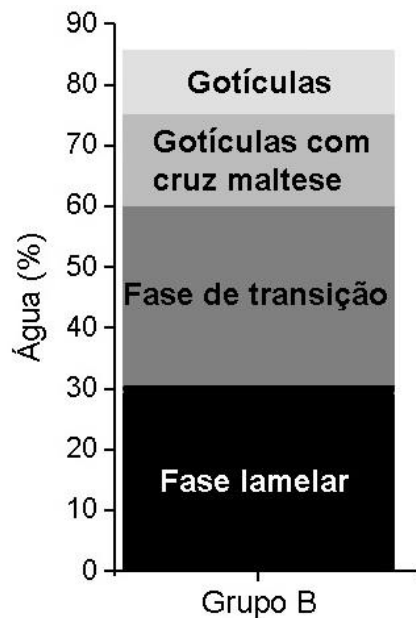


Figura 11. Diagrama de fases das formulações do grupo B.

5.2 Caracterização das formulações

5.2.1 Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial zeta (do sistema nanodisperso estabilizado por fase líquido-cristalina):

Como apenas as formulações A-70 e B-70 apresentaram característica nanoparticulada ao microscópio, estudos subsequentes foram realizados para avaliação do diâmetro das gotículas utilizando espalhamento dinâmico da luz. O tamanho das gotículas e índice de polidispersão (PDI) estão expressos na **Tabela 4**,

e gráficos representativos da distribuição do diâmetro estão representados na **Figura 12**.

Como pode ser observado na **Figura 12**, ambas as formulações apresentaram 2 populações, o que é refletido no valor de PDI superior a 0,25. O diâmetro hidrodinâmico das partículas (*z average*) de ambas as formulações fornecido pelo equipamento foi inferior a 600 nm, o que é um bom resultado considerando que elas são obtidas sem nenhum método para redução do diâmetro (como por exemplo sonicação). Comparando as duas formulações, as populações de B-70 apresentaram diâmetro um pouco maiores, o que indica que a presença de polisorbato, poloxamer e glicerol em A-70 contribui para reduzir o diâmetro das gotículas. Vale ressaltar que nanoemulsões podem ser formadas por mais de uma população de gotículas (McClements, 2012).

Ambas as formulações apresentaram potencial zeta negativo (**Tabela 5**), abaixo de -20 mV. Deve ser ressaltado que, no intuito de minimizar a variabilidade, determinamos a condutividade das amostras, que permaneceu entre 0,03 e 0,05 mS/cm.

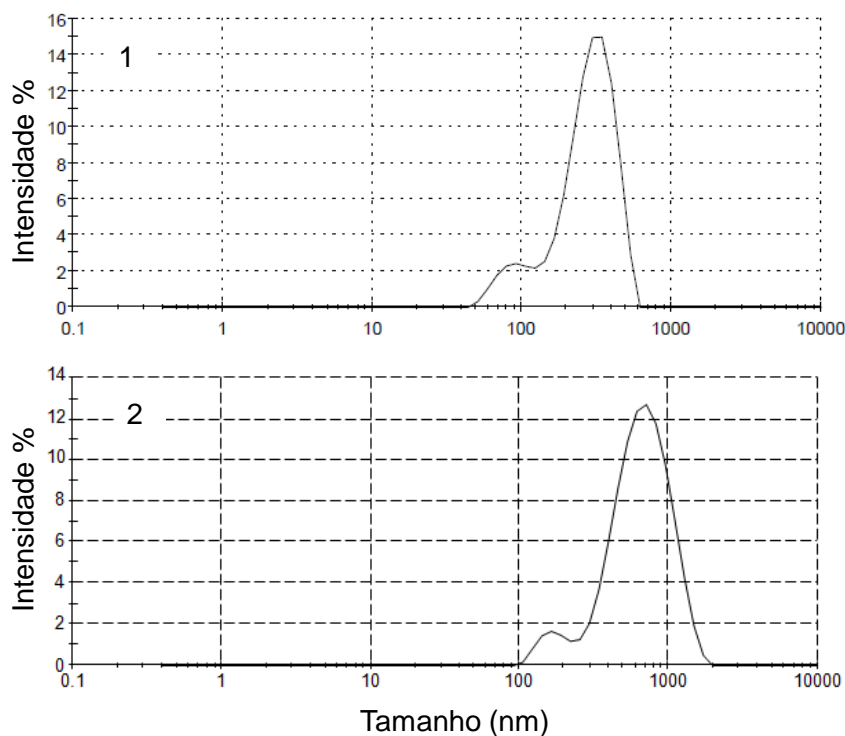


Figura 12. Gráficos da distribuição de tamanho das gotículas das formulações. (1) formulação A-70 e (2) formulação B-70.

Tabela 4. Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das formulações selecionadas.

Formulações	Pico 1 (nm)	Pico 2 (nm)	PDI
A-70	68,6 ± 30,2	371,4 ± 96,6	0,488 ± 0,066
B-70	183.4 ± 2.5	595,7 ± 70.2	0,324 ± 0,007

Tabela 5. Potencial zeta e pH das formulações selecionadas.

Formulações	Potencial Zeta (mV)	pH
A-70	- 20,0 ± 1,2	5
B-70	- 15,7 ± 1,8	6

5.2.2 Avaliação do comportamento reológico e viscosidade:

A reologia é o estudo do comportamento deformacional e do fluxo da matéria quando submetida a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas em um intervalo de tempo; o material pode ser classificado, de forma bem simplificada, como tendo comportamento newtoniano ou não newtoniano (Damasceno et al., 2011; Barnes, Hutton, Walters, 1989). O fluido é classificado como newtoniano quando o seu comportamento segue a Lei de Newton da viscosidade, que estabelece que a relação entre a tensão de cisalhamento e o gradiente local de velocidade é definida através de uma relação linear, sendo a constante de proporcionalidade a viscosidade do fluido (Florence, Attwood, Rothschild, 2011; Damasceno et al., 2011; Barnes, Hutton, Walters, 1989). Ocorre que, geralmente, as emulsões não apresentam fluxo newtoniano (Florence, Attwood, Rothschild, 2011), e na maioria dos casos a viscosidade das emulsões diminui quando aumentamos a taxa de cisalhamento, o que é característico de comportamento pseudoplástico (Barnes, Hutton, Walters, 1989). Utilizando a lei de potência, determinamos o índice de potência (n).

Observa-se que quando o valor de n corresponde a 1, a viscosidade é dada por uma constante, ou seja, temos um fluido newtoniano. Quando $n > 1$, a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento, caracterizando um fluido dilatante. Por outro lado, quando $n < 1$, a viscosidade é reduzida com o aumento da taxa de cisalhamento, o que caracteriza um fluido pseudoplástico (Gabbanelli, Drazer, Koplik, 2005).

Na **Tabela 6**, podemos verificar que o índice de potência de todas as formulações foi abaixo de 1, o que caracteriza um comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico. Coerentemente com este resultado, ao analisarmos os gráficos de viscosidade em função da tensão de cisalhamento (**Figura 13**), constatamos que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento.

Tabela 6. Índice de comportamento determinado utilizando a *lei de potência*.

Formulação	Índice de comportamento do fluido
A-20	0,802
A-70	0,447
B-20	0,332
B-70	0,710

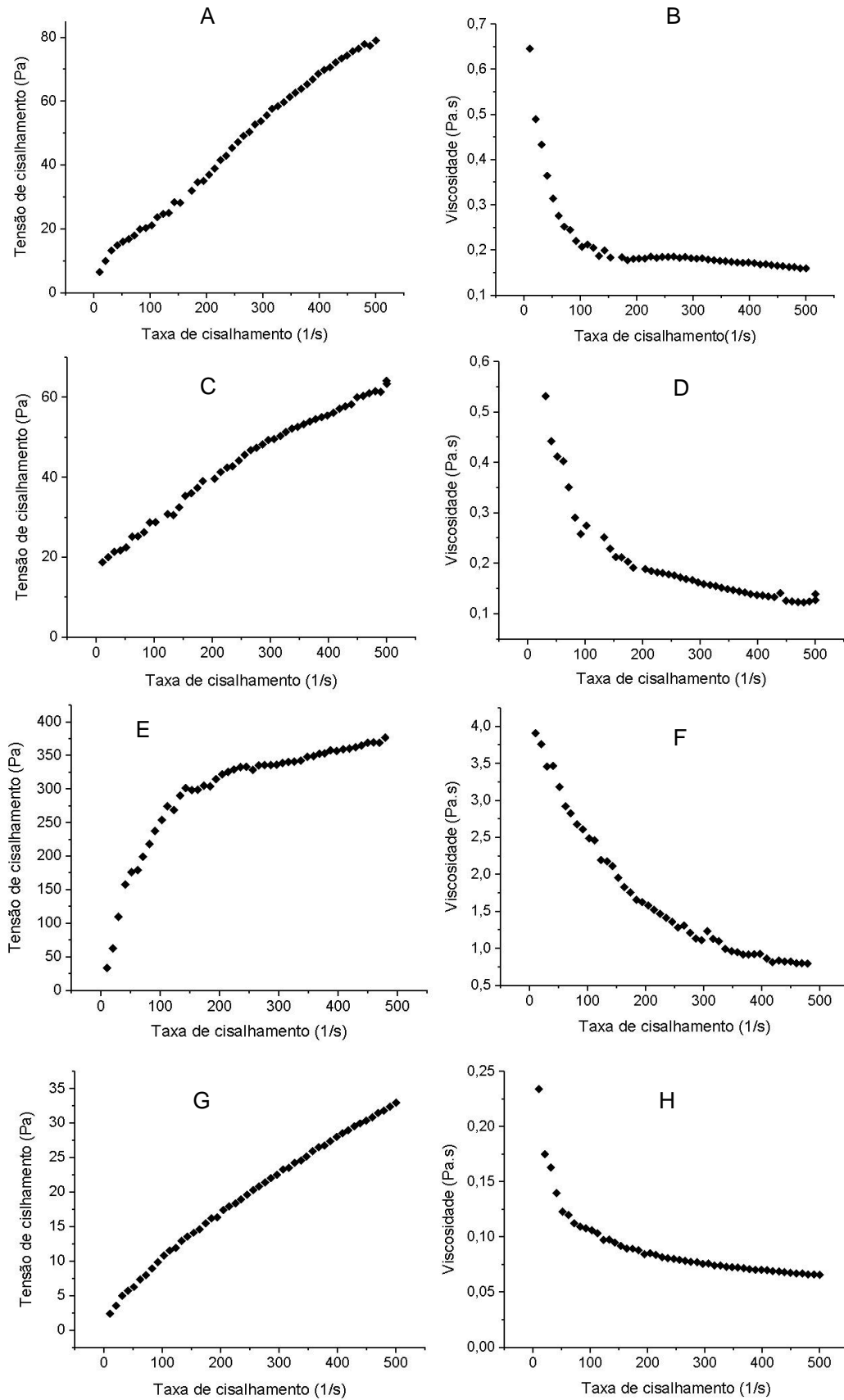


Figura 13. Comportamento reológico (coluna da esquerda) e viscosidade (coluna da direita) das formulações estudadas. A e B: A-20, C e D: A-70; E e F: B-20; G e H: B-70.

5.3 Avaliação do potencial bioadesivo

A bioadesão é a capacidade de adesão entre duas membranas biológicas ou entre uma membrana biológica e uma superfície sintética. O termo bioadesão é utilizado para descrever a adesão de um sistema de entrega de fármaco bioadesivo e uma membrana biológica (por exemplo a pele) (Mathiowitz, Chickering III, Lehr, 1999). As vantagens de sistemas bioadesivos como transportadores de fármacos incluem o prolongamento do tempo de permanência no local de absorção, intensificação do contato com a barreira epitelial e diminuição da frequência de aplicação do produto, o que leva a uma melhor adesão ao tratamento pelo paciente (Fonseca-Santos et al., 2016).

Analisando os dados do potencial de bioadesão (**Tabela 7**), verificamos que as formulações A-20 e A-70, apresentaram um trabalho de adesão 2,3 vezes e 1,9 vezes maior que a água, utilizada como controle, enquanto B-20 e B-70, apresentam um trabalho de adesão aproximadamente 2,6 vezes e 1,9 vezes, maior que o controle. De maneira semelhante, a força de adesão das formulações foi superior à da água, onde a força de A-20 e A-70 foi aproximadamente 1,5 e 1,2 vezes maior que a água, enquanto que a força de adesão de B-20 e B-70 foi 1,9 e 1,2 vezes maior que o controle. Entre as formulações não houve diferença acentuada.

Tabela 7. Parâmetros determinados no teste de bioadesão *in vitro*.

Formulações	Força de adesão (N)	Trabalho de adesão (g.s)
Água	0,0041 ± 0,0002	1,555 ± 0,253
A-20	0,0062 ± 0,0002	3,631 ± 0,108
A-70	0,0051 ± 0,0002	2,941 ± 0,137
B-20	0,0079 ± 0,0002	4,118 ± 0,213
B-70	0,0051 ± 0,0002	3,020 ± 0,064

Comparando as formulações com 20% de água, verificamos que B-20 apresenta potencial bioadesivo um pouco maior que A-20, enquanto que as formulações com 70% apresentam potencial bioadesivo semelhante.

5.4 Padronização do método de CLAE

Avaliamos a penetração cutânea do pró-fármaco dexametasona-TBZ nas camadas da pele (índice de retenção ou localização cutânea) e na fase receptora (índice de permeação transdérmica ou percutânea) através da quantificação por CLAE.

Sob as condições cromatográficas padronizadas, o pró-fármaco dexametasona-TBZ foi eluído com tempo de retenção de 5,8 min (**Figura 14**). Utilizamos uma curva de calibração nas concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, e 50 µg/mL diluída em metanol, sendo que, para cada experimento, foi analisada uma curva de calibração. Uma curva de calibração representativa está representada na **Figura 15**. O coeficiente de determinação (R^2) das curvas obtidas foi sempre superior a 0,997, demonstrando linearidade no intervalo de 0,5 a 50 µg/mL.

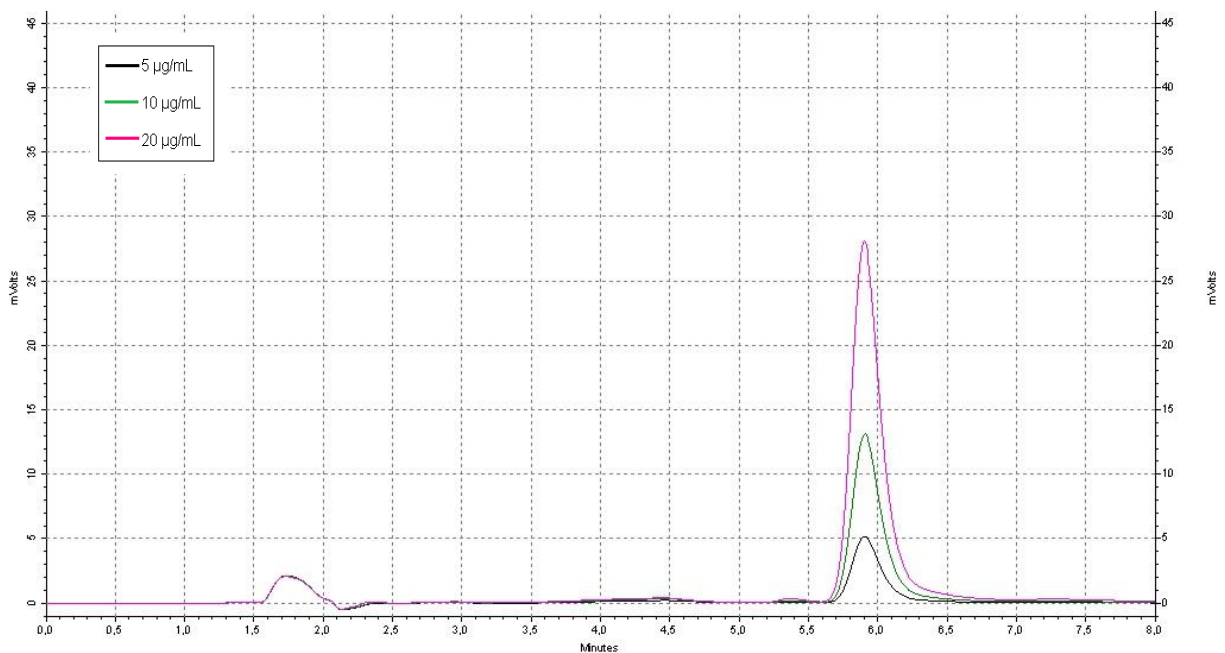


Figura 14. Cromatograma representativo de uma curva de calibração demonstrando a variação da área do pico em função da concentração.

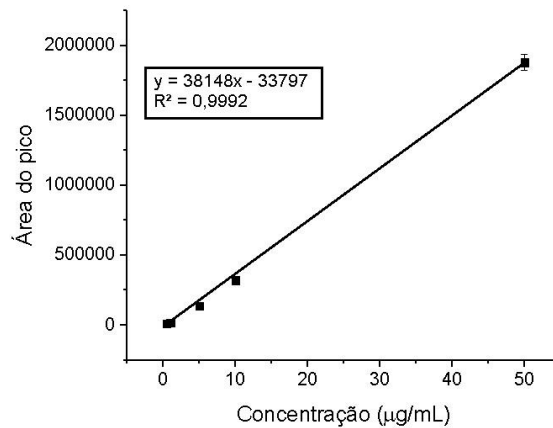


Figura 15. Curva de calibração utilizada na quantificação do pró-fármaco.

Para a padronização do método, também analisamos homogenatos do estrato córneo e das camadas viáveis da pele sem nenhum tratamento (branco) para avaliação de interferentes. Como pode ser observado na **Figura 16**, o pró-fármaco é passível de quantificação no estrato córneo e camadas viáveis da pele, e não há componentes cutâneos com tempo de retenção semelhante ao pró-fármaco, demonstrando a ausência de interferentes.

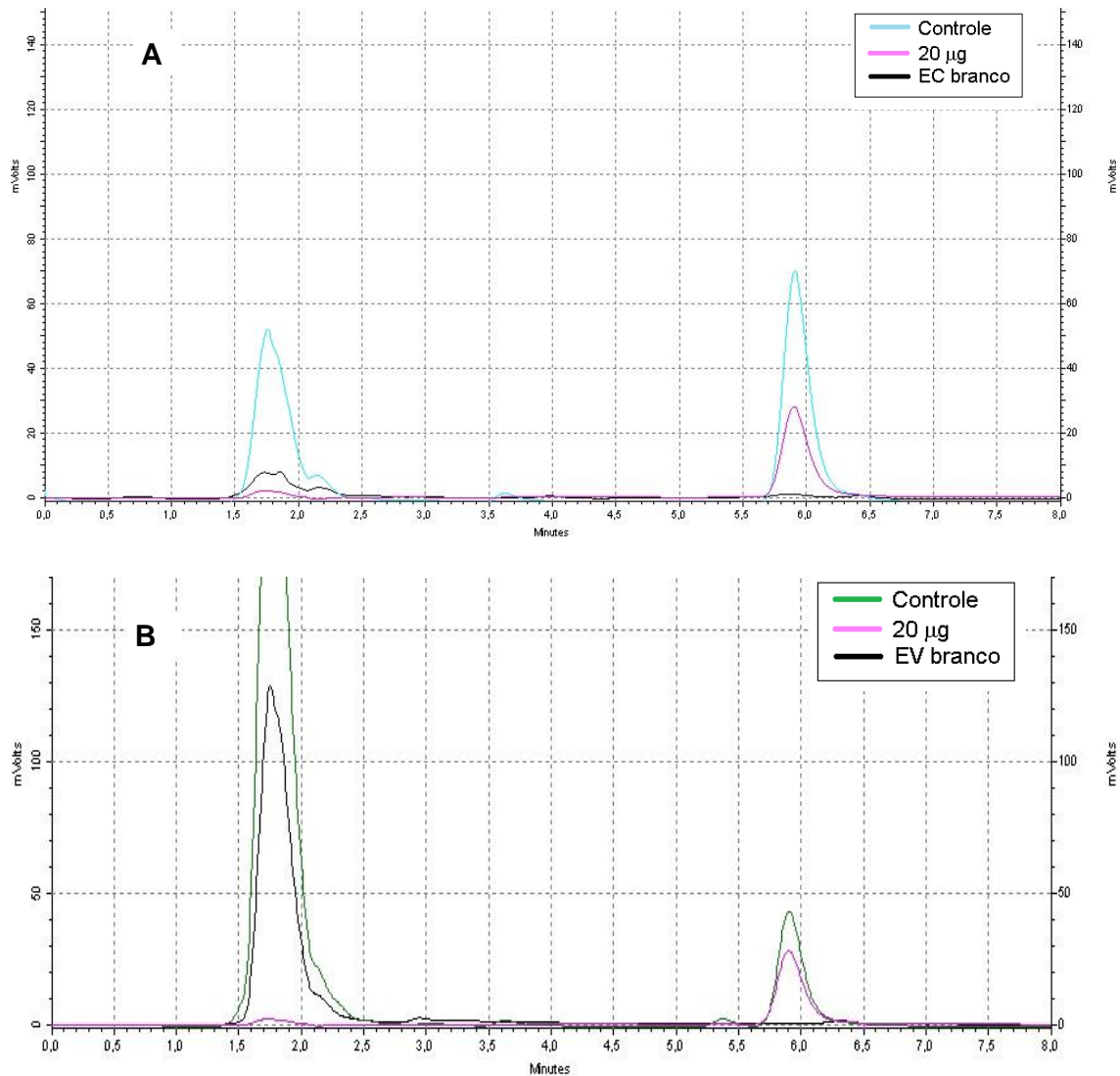


Figura 16. Cromatogramas demonstrando a especificidade do método. (A) Cromatograma representando o branco do EC em comparação com homogenato de EC após tratamento com a formulação controle do pró-fármaco e a solução de calibração de 20 µg/mL. (B) Cromatograma do branco da EV, em comparação com homogenato de EV após tratamento com a formulação controle do pró-fármaco e a solução de calibração de 20 µg/mL.

5.5 Incorporação do pró-fármaco e estabilidade nas formulações

A máxima concentração passível de incorporação do pró-fármaco dexametasona-TBZ foi 1%, e por isso, foi a concentração selecionada para estudos subsequentes.

O fármaco em estudo neste projeto sofre hidrólise em meio aquoso, e devido a essa característica, realizamos um estudo de estabilidade do fármaco após a

incorporação nas formulações contendo água. Uma vez que a formulação destina-se à aplicação tópica, estabelecemos o tempo de 8 h como o padrão para o estudo de penetração cutânea. Sendo necessário garantir a integridade do pró-fármaco durante o estudo de penetração, esse intervalo de tempo foi utilizado para avaliação da estabilidade do composto na formulação contendo água.

Observamos que a concentração do pró-fármaco dexametasona-TBZ permaneceu estável durante 8 h, com exceção de A-20, na qual, após 2 h, a concentração do fármaco reduziu para cerca de 85% da concentração inicial; em 8 h, a concentração foi de ~ 80% da inicial (**Figura 17**). Na **Figura 18**, que apresenta micrografias resultantes da observação da fase em microscópio de luz polarizada, podemos visualizar que a incorporação do fármaco não induz alteração de fase nem inibe a formação das fases. É importante ressaltar a presença de alguns cristais de pró-fármaco não dissolvidos nas formulações, como marcado pelas setas na Figura 12, o que sugere que pode haver regiões mais heterogêneas nas formulações e justifica a variabilidade encontrada nas concentrações ao longo do tempo de análise.

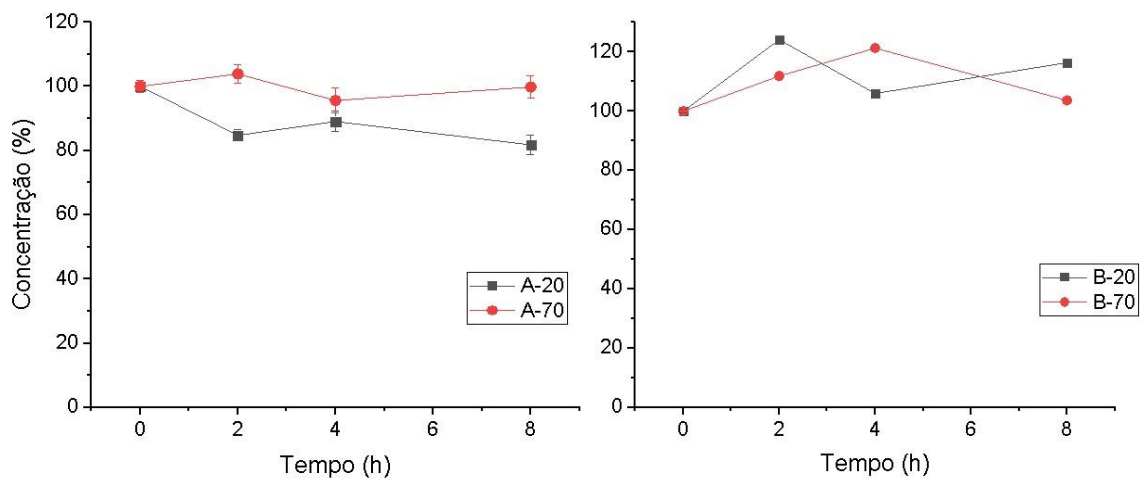


Figura 17. Concentração do fármaco após incorporado as formulações através do tempo.

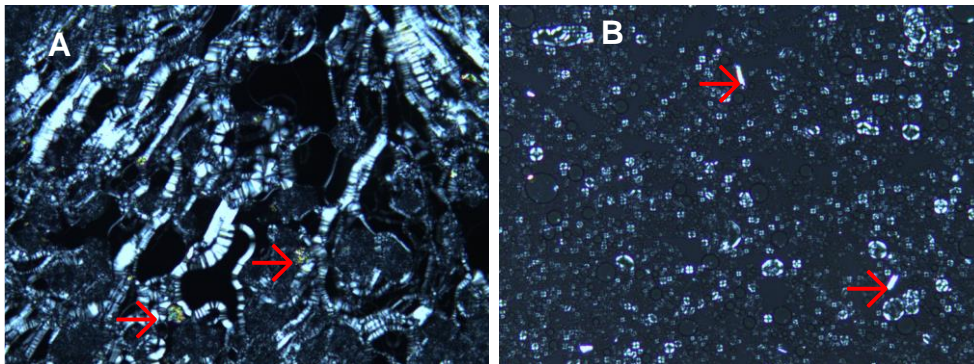


Figura 18. Fotomicrografias das formulações visualizadas sob luz polarizada após incorporação do fármaco (A) B-20 e (B) B-70.

Sabendo que a presença de água influencia a estabilidade do pró-fármaco, avaliamos também sua estabilidade apenas na mistura de tensoativo e fase oleosa da formulação selecionada (B-70) pelo período de 28 dias. Constatamos que no dia 7, a concentração inicial do fármaco foi reduzida em cerca de 38% da concentração inicial (**Figura 19**). Ao longo dos 21 dias subsequentes, não constatamos novas variações na concentração, e o teor do fármaco se manteve estável quando comparado ao dia 7, se mantendo ao redor de 62% da concentração inicial. A degradação do fármaco fica evidente quando analisamos os cromatogramas (**Figura 20**) das alíquotas das formulações, nos quais, além da diminuição da altura e área do pico de interesse a partir do dia 7, surgem outros picos que não existiam no dia 1, sinalizando o aparecimento de substâncias que não estavam presentes anteriormente, e que podem ser produtos da degradação do pró-fármaco. Não realizamos nenhum estudo para identificação destas novas substâncias.

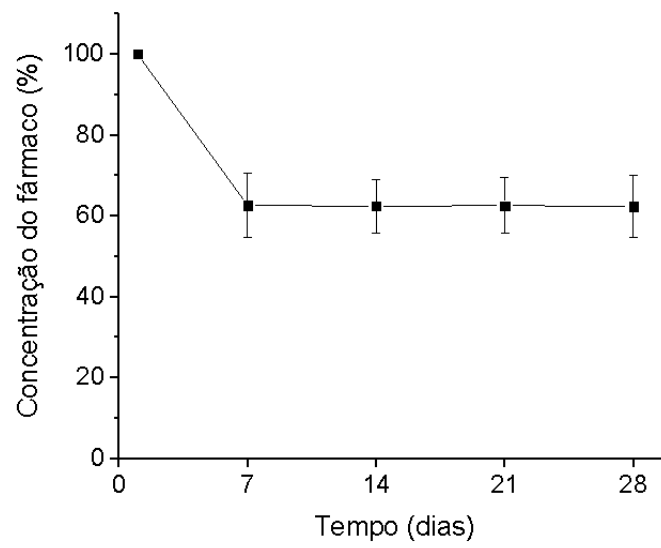
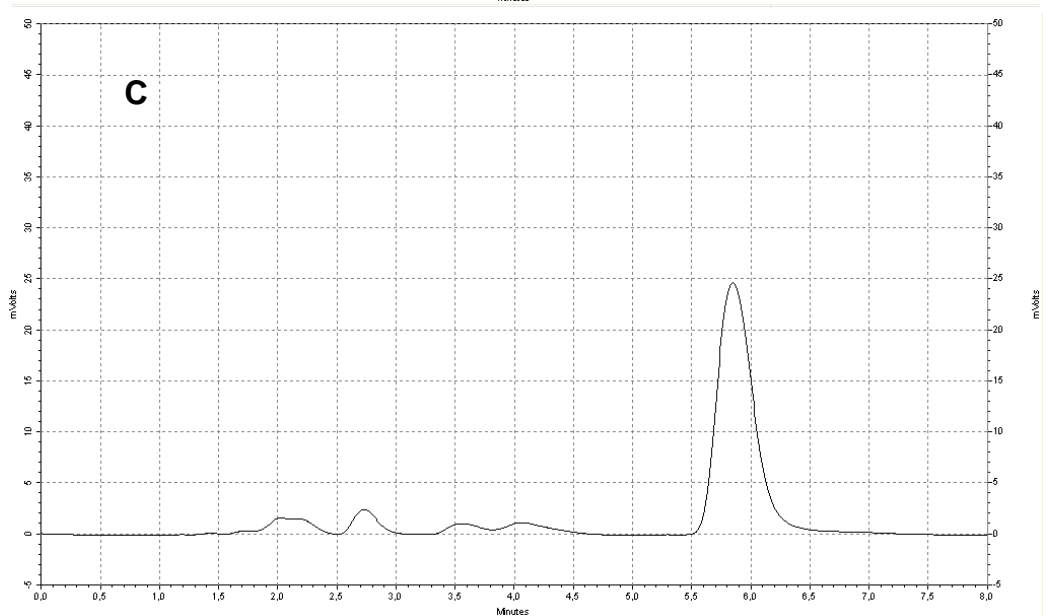
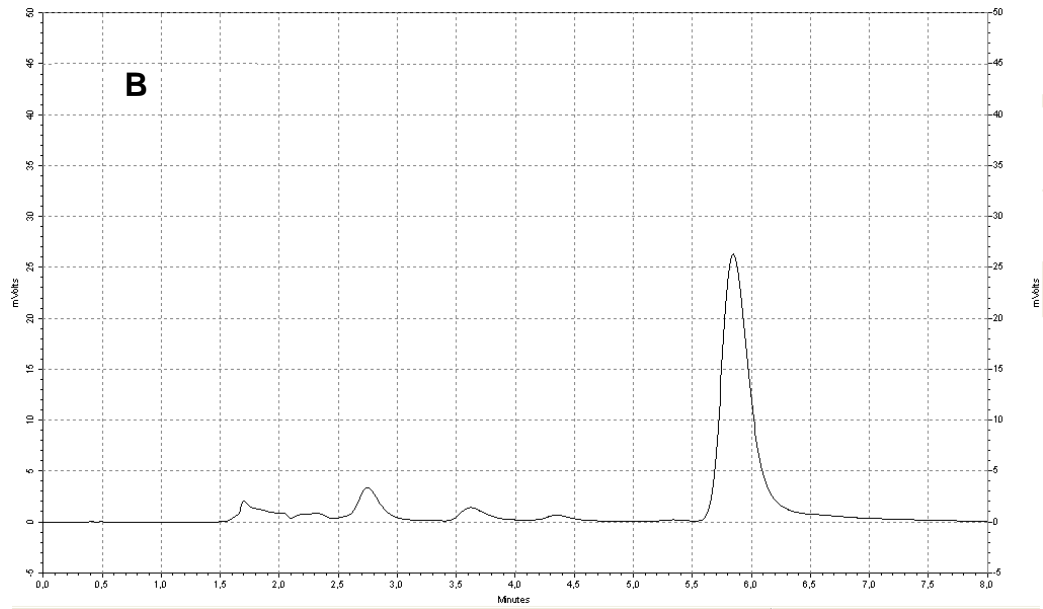
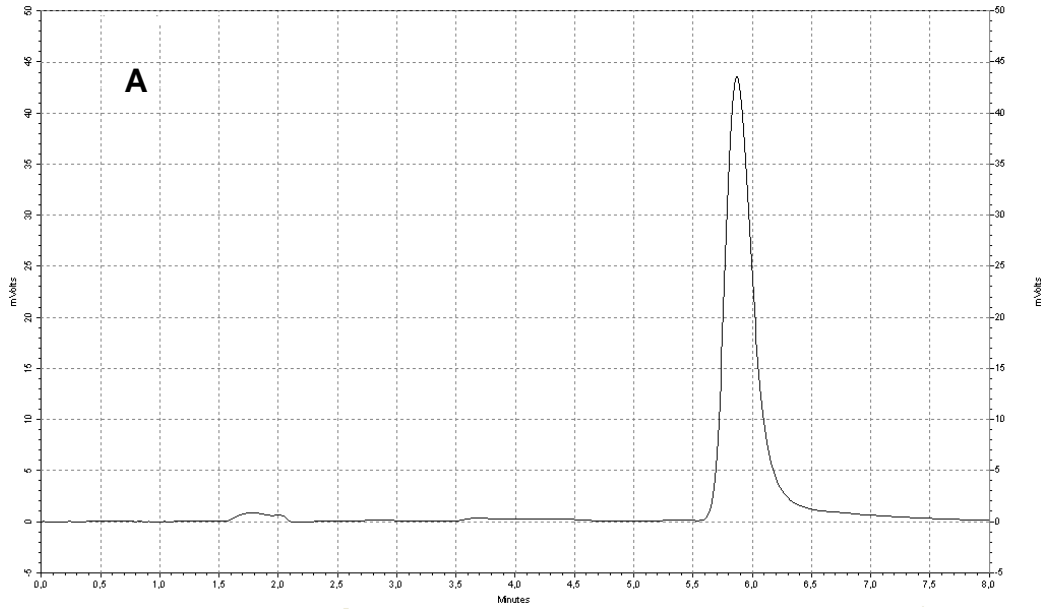


Figura 19. Concentração do pró-fármaco após incorporado na mistura de tensoativo e fase oleosa da formulação B-70 ao longo do tempo.



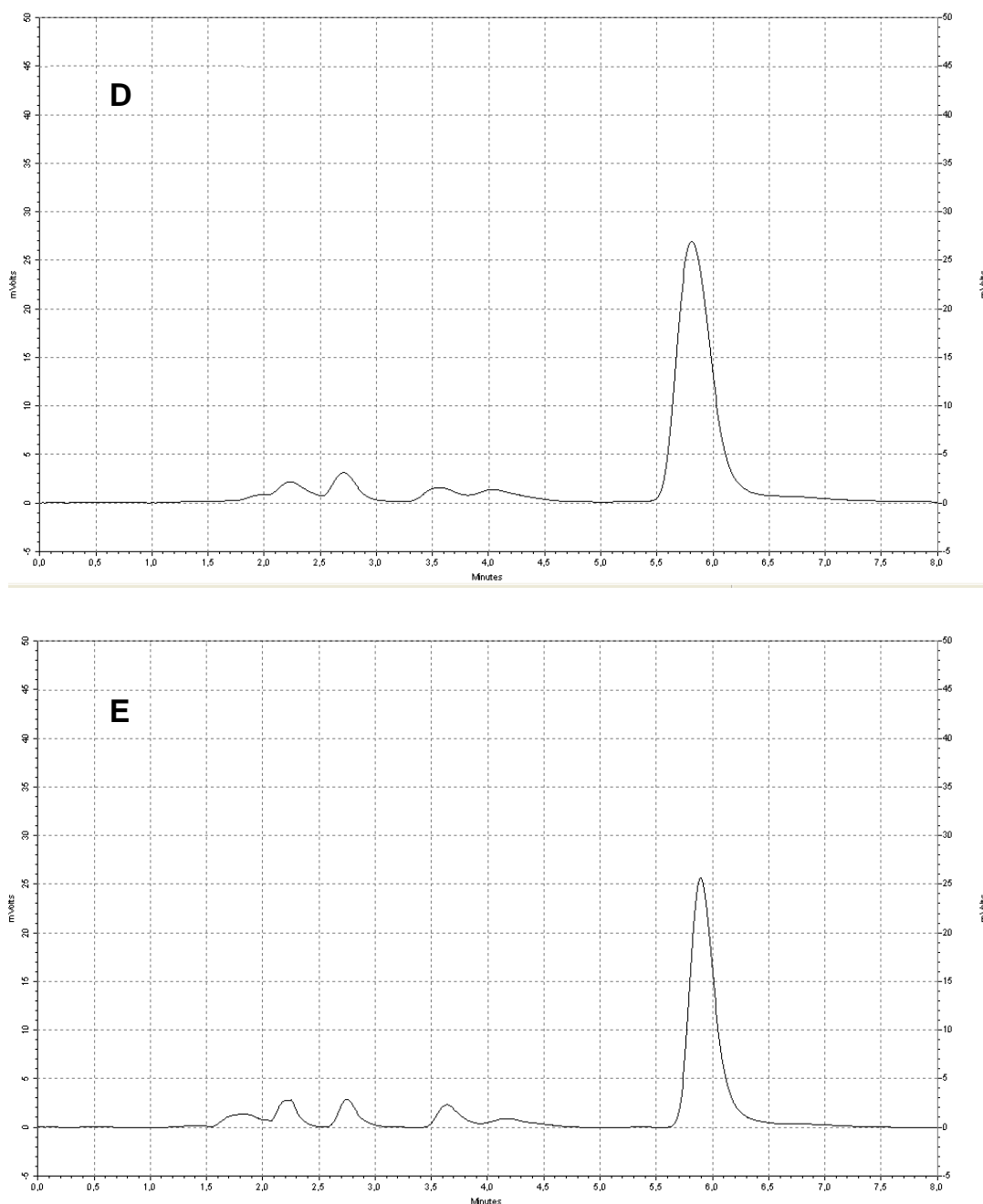


Figura 20. Cromatograma representativo da concentração do pró-fármaco dexametasona-TBZ ao longo do tempo. (A) dia 1, (B) dia 7, (C) dia 14, (D) dia 21 e (E) dia 28.

5.6 Avaliação da formulação sobre a permeabilidade e penetração cutânea do pró-fármaco

5.6.1 Avaliação da perda de água transepidérmica

As formulações selecionadas possuem componentes como glicerol e ácido oleico que tem a capacidade de promover a penetração cutânea (Williams, Barry, 2012; Smyth et al., 2002; Kogan, Garti, 2006; Lopes, Collett, Bentley, 2005; Lopes, Murphy, Nornoo, 2009). A fim de estabelecer relações entre o aumento da penetração e alterações na permeabilidade cutânea para que entendamos possíveis mecanismos de promoção da penetração, a perda de água transepidérmica foi utilizada como índice da permeabilidade do tecido. Foi avaliado o efeito do tratamento com a formulação por 8 h sobre a perda de água transepidérmica (**Figura 21**).

O efeito da formulação A-20 sobre a perda de água transepidérmica foi o mais pronunciado (4,5 vezes comparado ao óleo de girassol), o que sugere sua capacidade de afetar a barreira cutânea da pele, muito provavelmente causando desorganização do estrato córneo (Pepe et al., 2012; Lopes, Collett, Bentley, 2005; Lopes, Murphy, Nornoo, 2009; Smyth et al., 2002; Pinnagoda et al. 1990; Pinnagoda et al., 1989). Por outro lado, esses resultados sugerem que as formulações do grupo B não alteraram a permeabilidade cutânea, mantendo a integridade da função barreira da pele. Foi observada uma tendência à redução da perda de água transepidérmica quando do tratamento com B-70, mas a diferença não foi significativa ($p > 0.05$). Essa tendência pode favorecer a hidratação da pele, o que, por sua vez, pode ser um dos fatores de promoção da penetração cutânea. A ausência de aumento da perda de água transepidérmica era esperado dado a presença de fitoesfingosina, um dos tipos de ceramida que participa da composição do estrato córneo e portanto, sua função barreira (Skolova et al., 2017).

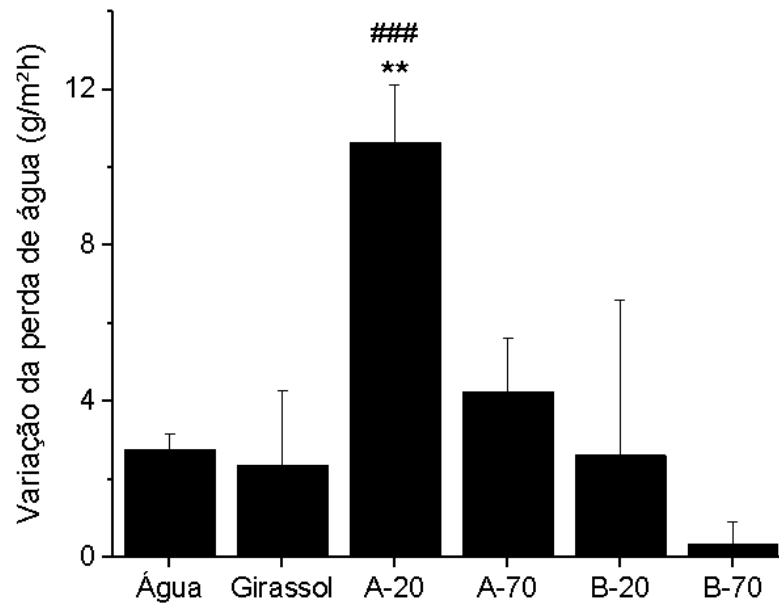


Figura 21. Efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 3 – 6 replicatas. ** $p < 0.01$ comparado a óleo de girassol. ### $p < 0,001$ comparado a água.

5.6.2 Avaliação da penetração cutânea do pró-fármaco

A quantidade de pró-fármaco dexta-TBZ transportado em cada camada da pele está representada nos gráficos da **Figura 22**.

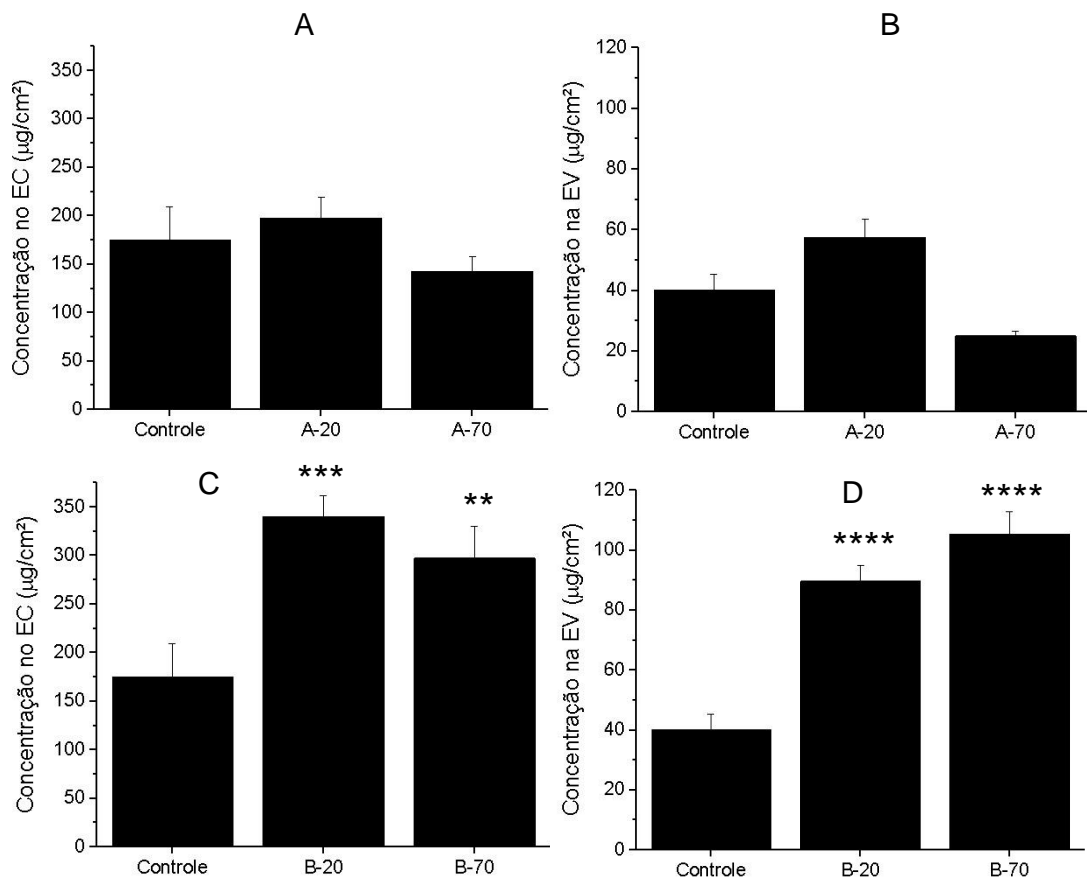


Figura 22. Penetração cutânea do pró-fármaco dexa-TBZ. (A) penetração no estrato córneo (EC) e (B) penetração na epiderme viável (EV) grupo A; (C) penetração no estrato córneo (EC) e (D) penetração na epiderme viável (EV) grupo B. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 5 – 6 replicatas. ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$), **** ($P < 0,0001$)

Analisando a **figura 22 A**, observa-se que, A-20 e A-70 promoveram a penetração de quantidades do pró-fármaco dexa-TBZ no estrato córneo (EC) muito semelhantes ao controle. Com relação à penetração na epiderme viável (EV), (**Figura 22 B**), a quantidade de pró-fármaco encontrada após tratamento com a formulação A-70 foi aproximadamente 1,60 vezes inferior à obtida com o controle, enquanto que após o tratamento com A-20, essa quantidade foi 1,45 vezes maior, embora essa diferença não seja significativa ($p > 0,05$). Esses dados indicam que nenhuma das formulações do grupo A foi eficaz em aumentar a penetração cutânea do pró-fármaco.

Por outro lado, todas as formulações do grupo B aumentaram a penetração do composto. No estrato córneo (**Figura 22 C**), esse aumento variou entre 1,70 e 2,00 vezes, e nas camadas viáveis (**Figura 22 D**), entre 2,30 e 2,60 vezes. Comparado ao

controle, observamos diferenças significativas, com $p < 0,001$ para B-20 e $p < 0,01$ para B-70 quando comparamos a penetração no EC; $p < 0,0001$ foi observado ao comparamos a penetração em EV mediada por ambas as formulações do grupo B e o controle. No entanto, não observamos diferenças significativas entre as duas formulações. Esses resultados demonstram que as formulações B-20 e B-70 são superiores as formulações do grupo A e controle para promoção da penetração cutânea do fármaco nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme).

Considerando que aplicamos 100 mg de formulação sobre a pele que as formulações continham 1% do fármaco, representamos na **Tabela 8** o percentual de fármaco que ficou retido em cada camada da pele. Através da tabela fica novamente claro a superioridade das formulações do grupo B.

Tabela 8. Percentual de fármaco retido nas camadas da pele.

Formulação	Estrato córneo (%)	Epiderme viável (%)
A-20	19,8	5,8
A-70	14,3	2,5
B-20	34,0	9,0
B-70	30,0	10,5
Controle	17,5	4,0

Vale ressaltar que não obtivemos concentração quantificável na fase receptora após tratamento com nenhuma das formulações. Isso pode ter ocorrido devido a hidrólise da molécula híbrida ou a sua baixa solubilidade na fase receptora. Para tentar diferenciar essas possibilidades, primeiramente avaliamos a solubilidade do pró-fármaco, e verificamos que até 50 $\mu\text{g/mL}$ não há turvação da solução. Ao aumentar a concentração para 100 $\mu\text{g/mL}$, a solução apresentou-se turva. Após a sonicação em banho, filtragem desse sistema, e quantificação do pró-fármaco por CLAE, observamos concentração final de apenas $8,4 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$.

No teste de estabilidade do pró-fármaco na fase receptora constatamos que dos 50 $\mu\text{g/mL}$ adicionamos à fase receptora, quantificamos apenas ~ 53,07% após 2 h, e ao final das 8 horas de experimento, a concentração quantificada foi de ~ 8,88% da concentração inicial (**Figura 23**). Esses resultados indicam que a ausência de permeação percutânea (ou transdérmica) quantificável pode, de fato, ter sido decorrente da degradação do pró-fármaco na fase receptora durante o experimento.

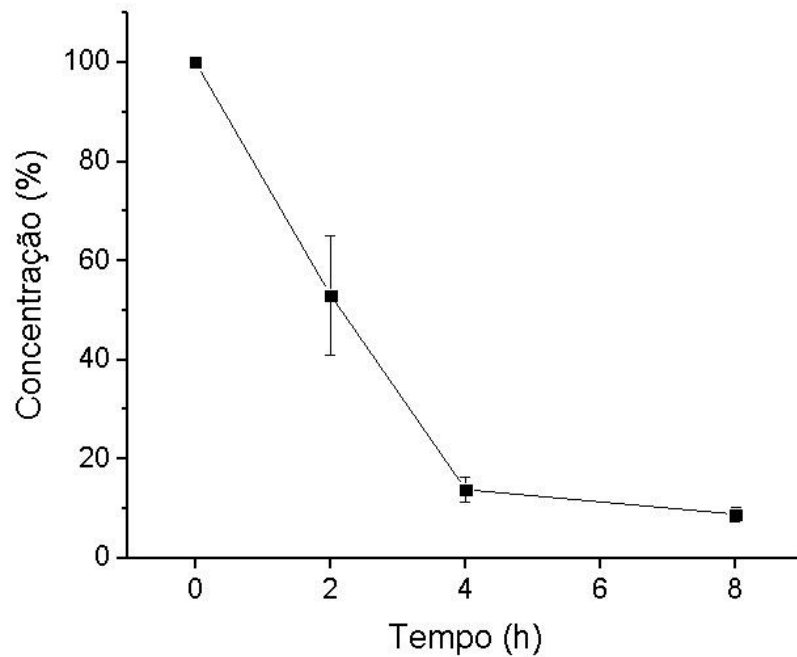


Figura 23. Concentração do pró-fármaco na fase receptora através do tempo.

5.7 Avaliação da irritação na pele dorsal do camundongo

Os componentes da formulação podem causar irritação, mesmo que a pele esteja íntegra, interferindo no estudo de eficácia, no qual o efeito da formulação será avaliado em modelo de psoríase induzida em camundongos. Para avaliar essa possibilidade, foi estudado o efeito das formulações sobre a histologia da pele íntegra. Pode-se observar na **Figura 24** um aumento pronunciado na espessura da epiderme mediada pelas formulações do grupo A. Mais especificamente, verificamos que as formulações A-20 ($38,28 \mu\text{m} \pm 5,05$) e A-70 ($39,50 \mu\text{m} \pm 7,76$) promoveram acantose significativa quando comparadas ao controle ($22,58 \mu\text{m} \pm 4,28$, **Figura 25**), $p < 0,0001$). Além disso, durante o experimento, foi visualizado o aparecimento de rubor e descamação na pele dorsal dos camundongos nos quais foi administrado as formulações A-20 e A-70. A formulação B-20 ($31,74 \mu\text{m} \pm 5,24$) promoveu espessamento da epiderme menos acentuado que as formulações do grupo A, entretanto gerou acantose significativa (1,4 vezes quando comparado ao controle, $p < 0,01$), enquanto B-70 ($21,10 \mu\text{m} \pm 2,67$) não promoveu acantose ($22,58 \mu\text{m} \pm 4,28$).

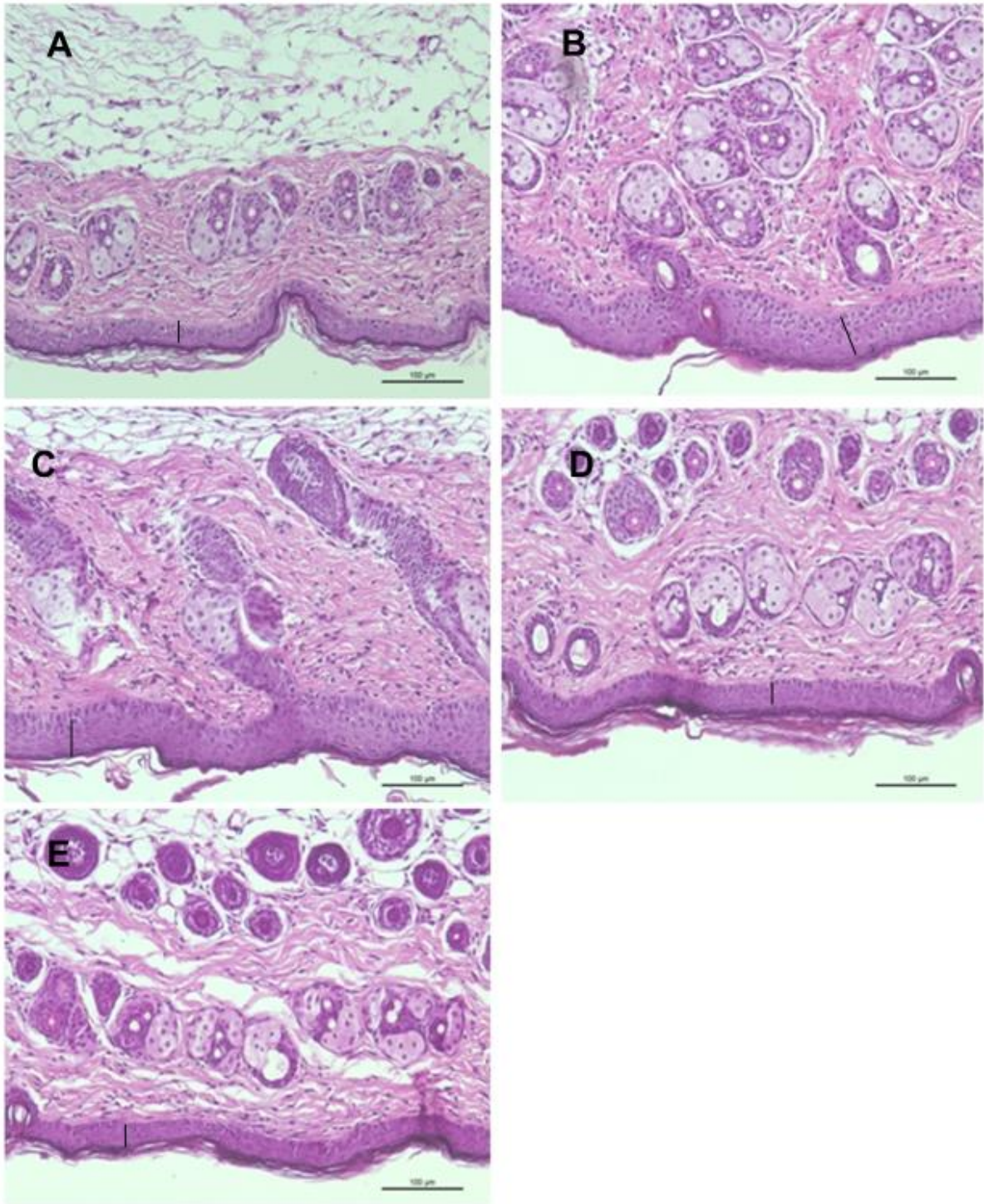


Figura 24. Efeitos na pele dorsal do camundongo com aplicação da formulação (A) Controle, (B) A-20, (C) A-70, (D) B-20, (E) B-70. Barra = 100 µm

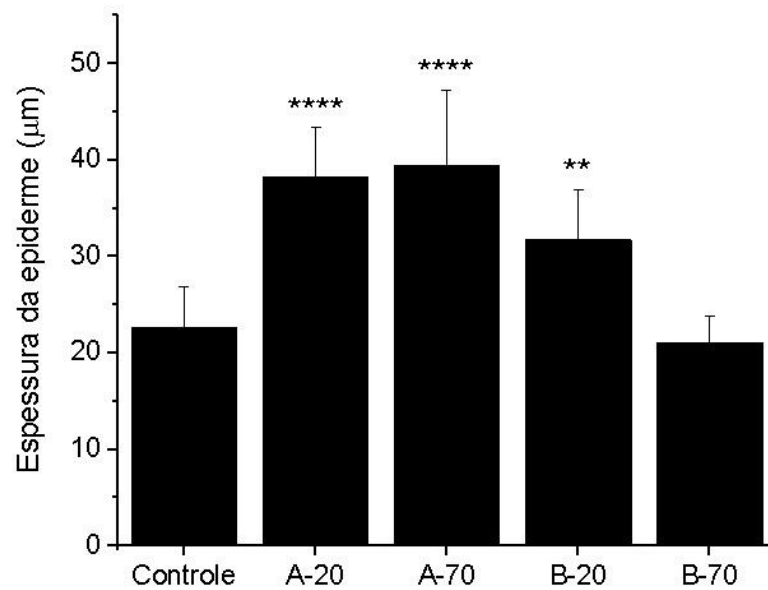


Figura 25. Espessura da epiderme da pele dorsal dos camundongos tratados com as diversas formulações. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 5 replicatas. ** ($P < 0,01$), **** ($P < 0,0001$).

5.8 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal

Analisando os gráficos da **Figura 26**, constatamos que as formulações do grupo A não promoveram aumento da atividade da MPO significativo quando comparado ao controle. Com relação as formulações do grupo B, a pele tratada com B-20 apresentou atividade da MPO 1,4 vezes maior quando comparada ao controle. A pele tratada com B-70 não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle.

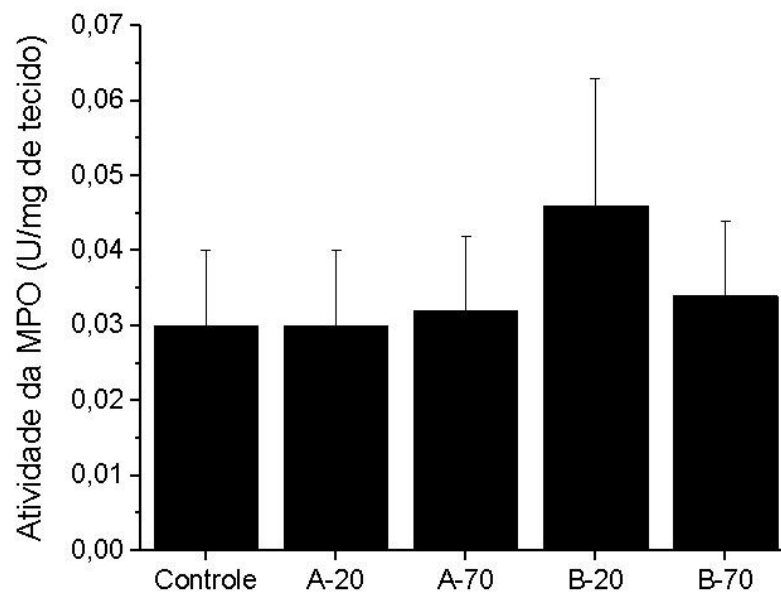


Figura 26. Gráficos da atividade da MPO em pele tratada com (A) formulações do grupo A e (B) formulações do grupo B. Dados apresentado com média \pm erro padrão de 5 – 9 replicatas.

5.9 Indução da psoríase e delineamento experimental

5.9.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

Os estudos de eficácia foram conduzidos com B-70 contendo as duas moléculas híbridas (dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT) separadamente. Avaliamos também o efeito do doador de H₂S ADT e da dexametasona individualmente como controles.

Os animais que foram submetidos à indução da psoríase experimental apresentaram aumento nos parâmetros de rubor e descamação da pele dorsal e espessamento da orelha; a partir do 2º ou 3º dia de protocolo sinais deste aumento começaram a surgir (**Figura 27 A, B e C**). Quando analisamos a área sob a curva do rubor (AUC, **Figura 27 D**), verificamos que somente os grupos tratados com dexametasona e dexametasona-TBZ apresentaram diminuição significativa do rubor quando comparado ao grupo psoríase sem tratamento; os grupos tratados com dexametasona-ADT e ADT não diferiram estatisticamente.

Ao analisarmos a descamação (**Figura 27 E**), verificamos que o ADT não parece ter efeito algum e que o tratamento com dexametasona-TBZ não reduz significativamente este parâmetro ($p > 0.05$), enquanto que a dexametasona e a

dexametasona-ADT reduziram significativamente a descamação quando comparado ao grupo psoríase. Dexametasona e a dexametasona-ADT reduziram significativamente também a descamação quando comparado ao ADT.

Com relação a espessura da orelha (**Figura 27 F**), a dexametasona reduziu significativamente a espessura quando comparada ao grupo psoríase e ADT, enquanto o grupo tratado com dexametasona-TBZ reduziu significativamente a acantose na orelha quando comparado aos grupos psoríase, ADT e dexametasona-ADT.

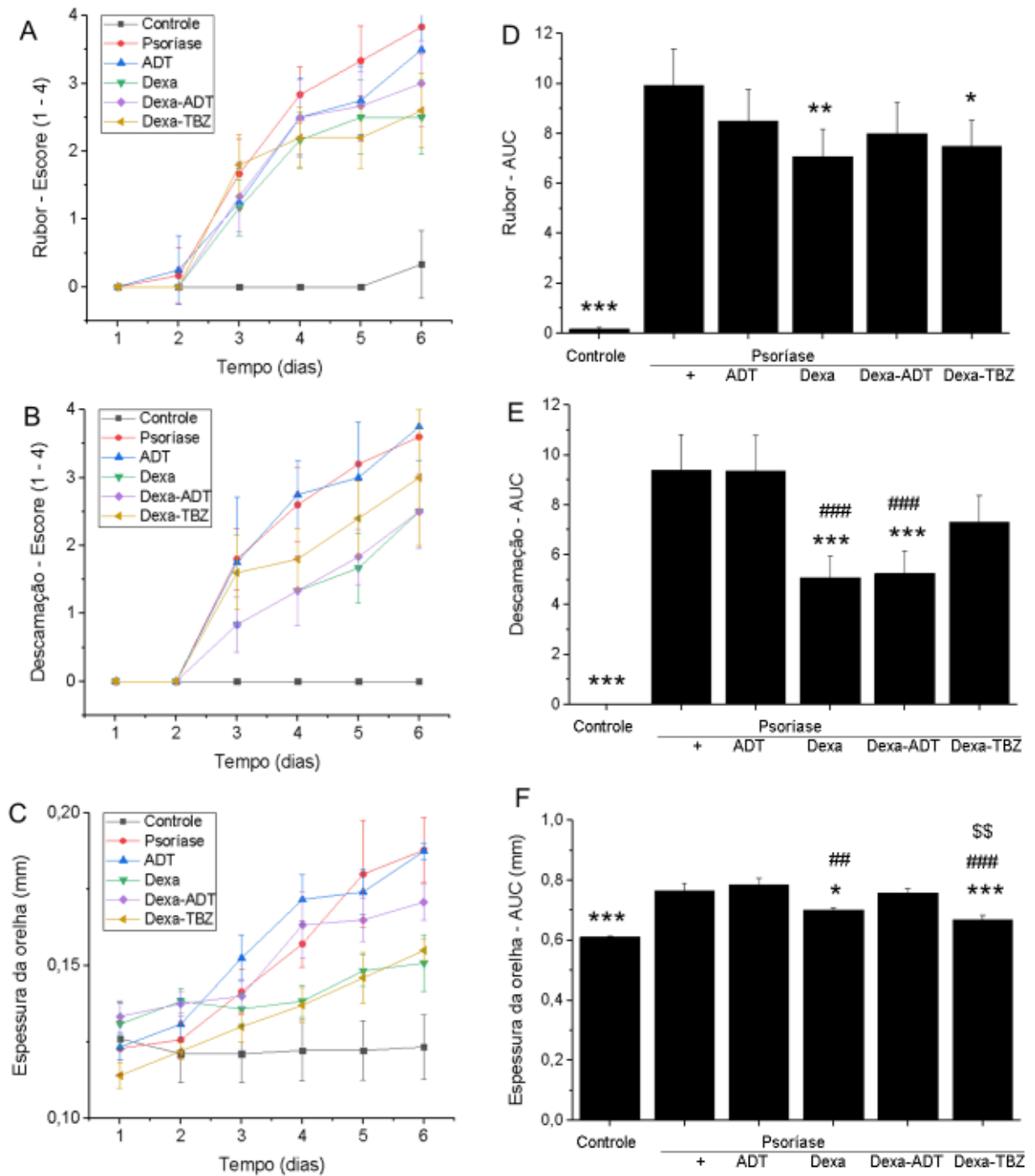


Figura 27. Efeitos dos diversos tratamentos nos parâmetros inflamatórios. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 6 a 8 replicatas. * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$) vs psoríase. ## ($P < 0,01$), ### ($P < 0,001$) vs ADT. \$\$ ($P < 0,01$) vs dexa-ADT.

5.9.2 Avaliação do prurido espontâneo

Avaliando os episódios de coceira espontânea (**Figura 28**), verificamos que todos os grupos com psoríase apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle, entretanto nenhum grupo de tratamento apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo psoríase sem tratamento. Alguns camundongos dos grupos de tratamento tiveram poucos episódios, enquanto outros tiveram vários, talvez em decorrência dos efeitos da formulação na pele dorsal não integra do camundongo com psoríase induzida pelo IMQ; esse comportamento levou a um elevado desvio padrão no experimento.

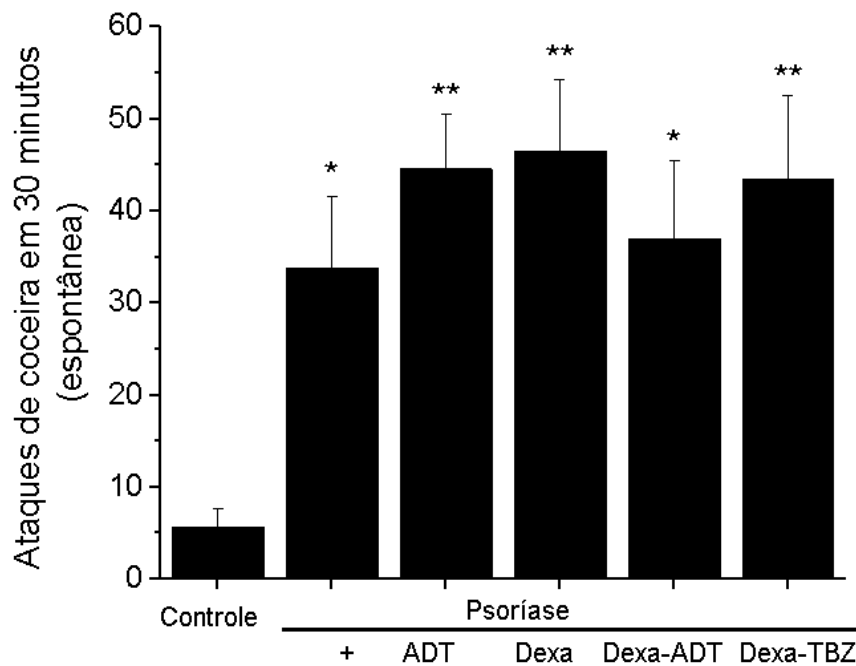


Figura 28. Episódios de coceira espontânea em 30 minutos. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 6 a 8 replicatas. * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) vs controle.

5.9.3 Avaliação histológica da pele dorsal

Avaliamos os efeitos dos tratamentos sobre a histologia da pele dorsal dos camundongos (**Figura 29**) e pode-se observar um aumento na espessura da epiderme em todos os grupos que tiveram a indução da psoríase experimental com IMQ, mas todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas comparado ao grupo psoríase não tratado. Mais especificamente, como pode ser observado na

Figura 30, ADT ($42,3 \mu\text{m} \pm 4,67$), dexametasona ($37,64 \mu\text{m} \pm 4,5$), dexametasona-ADT ($38,9 \mu\text{m} \pm 3,88$), dexametasona-TBZ ($37,41 \mu\text{m} \pm 4,38$) reduziram significativamente o espessamento da epiderme quando comparado ao grupo psoríase ($53,57 \mu\text{m} \pm 5,51$). Os grupos tratados com dexametasona e dexametasona-TBZ apresentaram uma redução significativa da acantose também quando comparado ao grupo tratado com ADT.

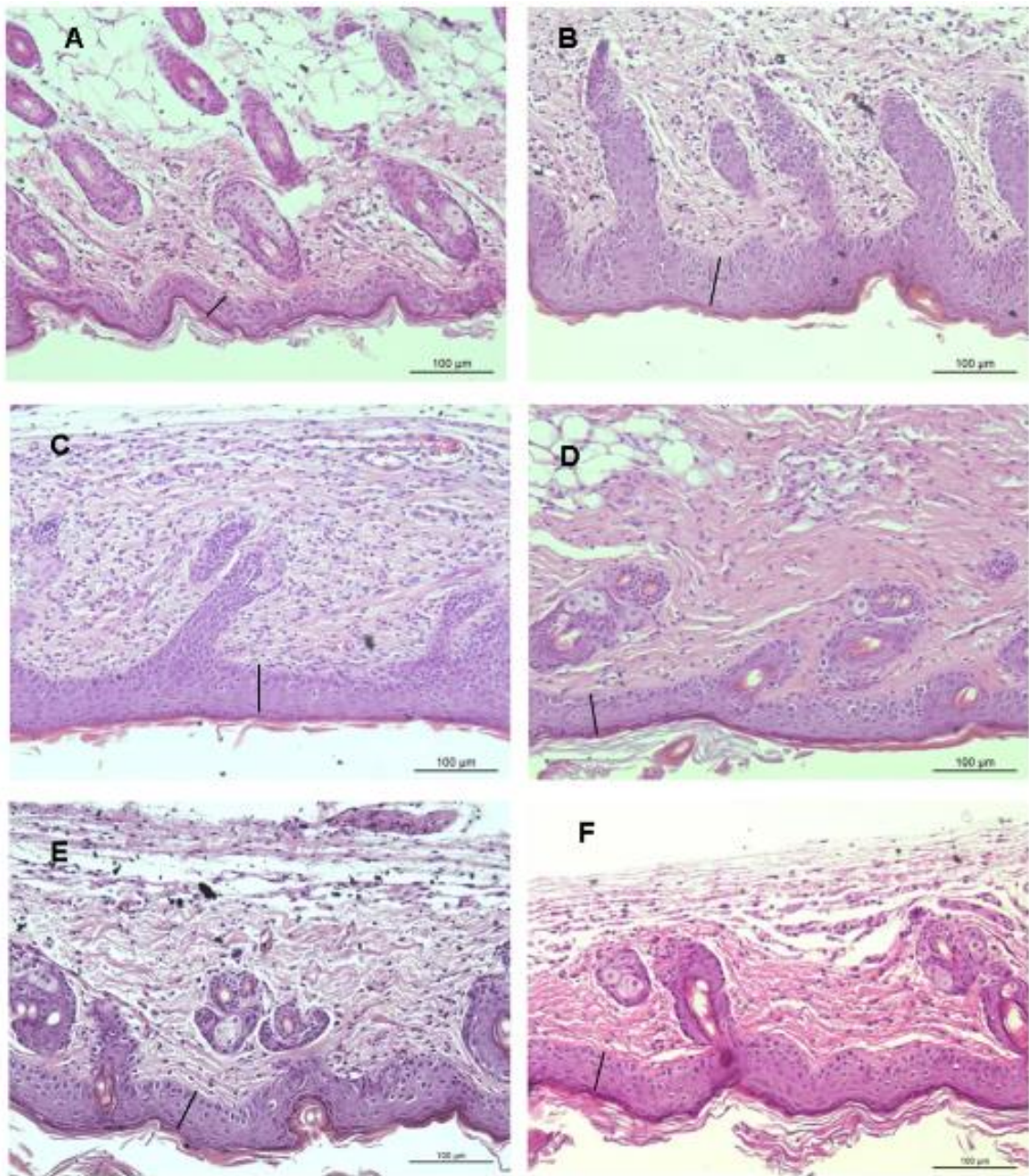


Figura 29. Efeitos na pele dorsal do camundongo com aplicação dos diversos tratamentos. (A) controle, (B) Psoríase, (C) ADT, (D) dexametasona, (E) dexa-ADT, (F) dexa-TBZ. Barra = $100 \mu\text{m}$.

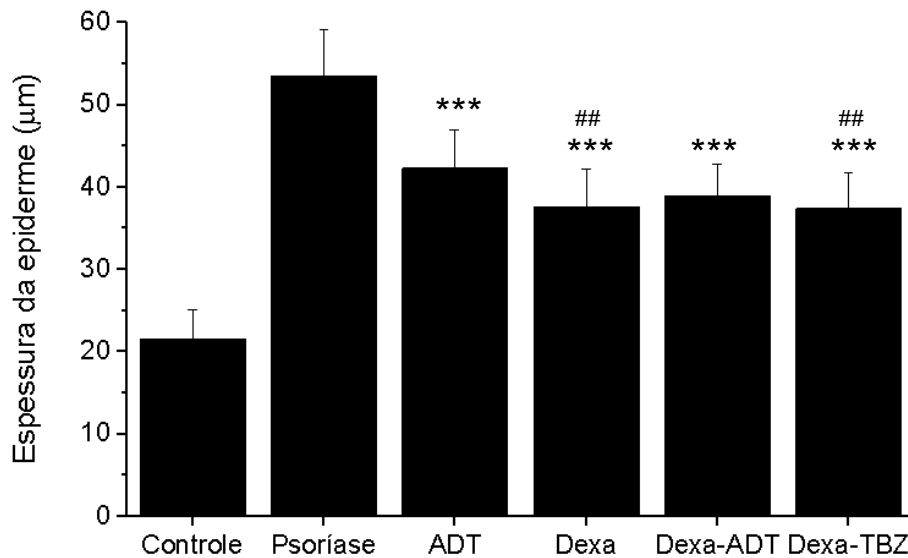


Figura 30. Espessura da epiderme da pele dorsal dos camundongos com os diversos tratamentos. Dados apresentados como média \pm erro padrão de 6 a 8 replicatas. *** ($P < 0,001$) vs psoríase. ## ($P < 0,01$) vs ADT.

5.9.4 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO) na pele dorsal.

Analisando a atividade da MPO (**Figura 31**), pode-se verificar uma expressiva inibição da atividade da MPO em todos os grupos que foram tratados por corticosteroide, apresentando uma redução significativa quando comparado ao grupo psoríase. O ADT parece não ter efeito sobre a atividade da MPO.

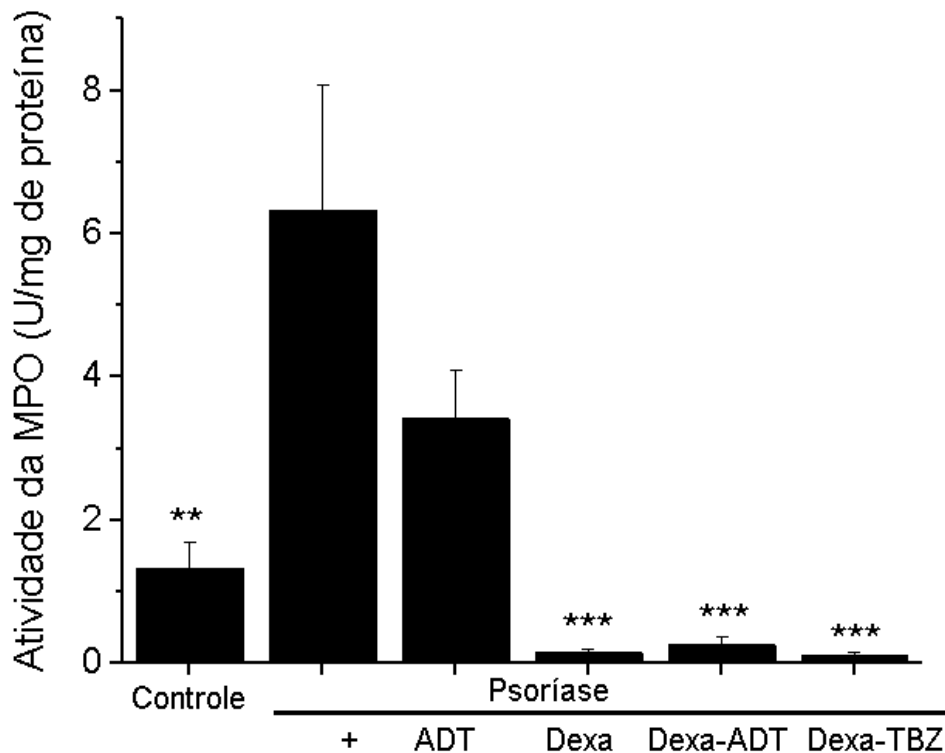


Figura 31. Gráficos da atividade da MPO. Dados apresentado com média \pm erro padrão de 6 – 8 replicatas. ** (P <0,01), *** (P<0,001) vs psoríase.

5.9.5 Quantificação de leucócitos no sangue periférico, medula óssea e análise do baço.

Analisando os leucócitos no sangue (**Figura 32**), verificamos que há um aumento da quantidade total de leucócitos nos grupos de animais com psoríase, apenas no grupo tratado com dexametasona-ADT houve redução significativa quando comparada com todos os outros grupos de tratamento e com o grupo psoríase. Não foi possível fazer a contagem diferencial dos leucócitos dos grupos ADT e dexametasona-ADT. Nos outros grupos não houve diferença significativa na quantidade dos diferentes tipos de leucócitos.

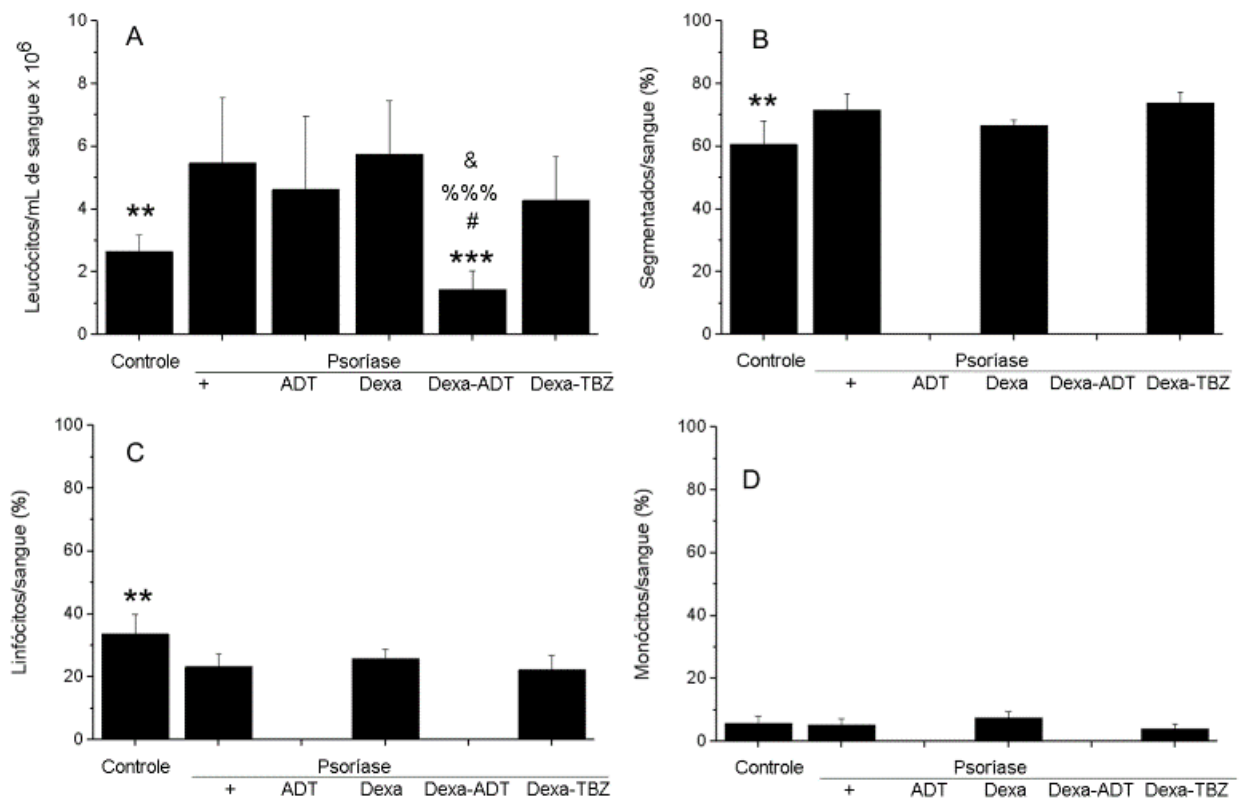


Figura 32. Efeito dos diferentes tratamentos na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue. (A) leucócitos totais, (B) segmentados, (C) linfócitos e (D) monócitos. Dados apresentado com média \pm erro padrão de 6 – 8 replicatas. ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$) vs psoríase. # ($P < 0,05$) vs ADT. %%% ($P < 0,001$) vs dexametasona. & ($P < 0,05$) vs dexametasona-TBZ.

Quando avaliamos os leucócitos na medula (**Figura 33**), não detectamos um aumento no número total de leucócitos, o grupo tratado com dexametasona foi o único a apresentar uma redução significativa quando comparado ao grupo psoríase. Quando comparamos os tratamentos, verificamos que os grupos tratados com dexametasona e dexametasona-ADT apresentam uma redução significativa do número de leucócitos na medula quando comparado ao grupo tratado com dexametasona-TBZ. Ao analisarmos a contagem diferencial, constatamos que os quatro grupos de tratamento aumentaram de forma significativa o número de leucócitos imaturos na medula. Quando comparamos os tratamentos, verificamos que o grupo tratado com os pro-fármacos dexametasona-ADT e dexametasona-TBZ apresentaram um aumento significativo também quando comparados ao ADT. Comportamento oposto foi encontrado no número de segmentados, onde os quatro grupos tratados tem uma redução significativa do número de leucócitos segmentados

quando comparado ao grupo psoríase. Com relação ao número de linfócitos, apenas o grupo tratado com dexametasona-TBZ apresentou uma redução significativa do número de linfócitos quando comparado ao grupo psoríase. Os outros grupos não diferiram estatisticamente.

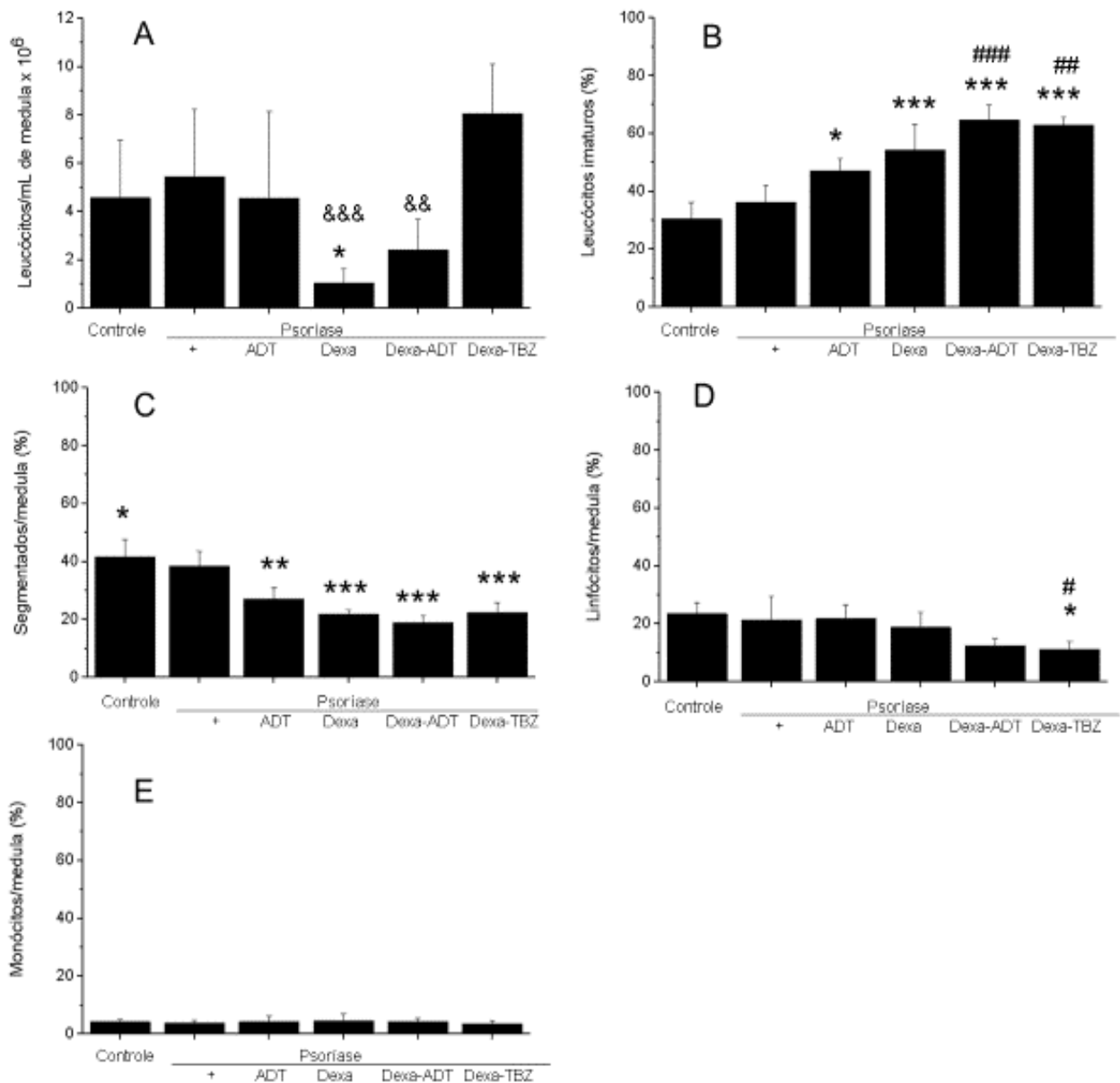


Figura 33. Efeito dos diferentes tratamentos na contagem total e diferencial de leucócitos na medula. (A) leucócitos totais, (B) leucócitos imaturos, (C) segmentados, (D) linfócitos e (E) monócitos. Dados apresentado com média \pm erro padrão de 6 – 8 replicatas. * (P <0,05), ** (P <0,01), *** (P <0,001) vs psoríase. # (P <0,05), ## (P <0,01), ### (P <0,001) vs ADT. & (P <0,05), && (P <0,01) vs dexametasona-TBZ.

Analisando o número de esplenócitos (**Figura 34 A**), verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos estudados, entretanto constatamos um aumento no peso do baço dos animais que com psoríase experimental. Os grupos tratados com os pro-fármacos dexametasona-ADT e dexametasona-TBZ apresentaram uma redução significativa no peso do baço quando comparados ao grupo psoríase (**Figura 34 B**). Esse efeito não foi visualizado nos grupos tratados com ADT e dexametasona. Quando comparamos os grupo tratamento verificamos que os grupos dexametasona-ADT e dexametasona-TBZ reduziram significativamente o peso do baço quando comparados aos grupos tratados com ADT e dexametasona. Com relação a variação do peso seco do baço (**Figura 34 C**), não obtivemos diferença significativa entre os grupo, todos ficaram ao redor de 80% de perda de peso.

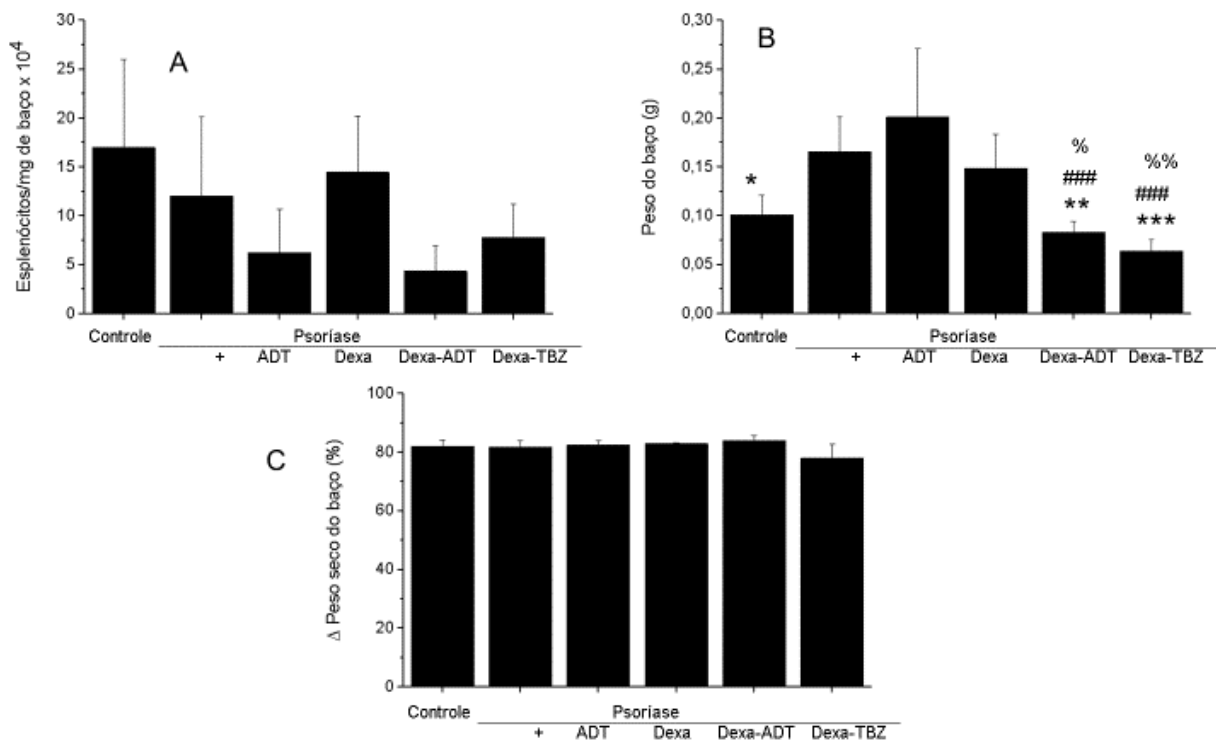


Figura 34. Efeito dos diferentes tratamentos no baço. (A) contagem total de esplenócitos (B) peso total do baço e (C) variação do peso do baço seco. Dados apresentado com média \pm erro padrão de 6 – 8 replicatas. * (P<0,05), ** (P <0,01), *** (P <0,001) vs psoríase. ### (P <0,001) vs ADT. % (P <0,05), %% (P <0,01) vs dexametasona.

6.0 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de formulações como carreadores de moléculas híbridas doadoras de H₂S, assim como a padronização do modelo experimental de psoríase para os testes destas formulações em camundongos foi realizado com sucesso neste estudo.

Em virtude da função barreira da pele, utilizamos nanocarreadores cujos componentes sejam capazes de facilitar a penetração cutânea do pró-fármaco. Incluímos glicerol, polisorbato 80 e ácido oleico nas formulações do grupo A. Já nas formulações do grupo B retiramos o ácido oleico e adicionamos componentes capazes de preservar a integridade da barreira cutânea a fim de evitar irritação e interferência com os parâmetros utilizados para acessar a eficácia da formulação em modelos *in vivo*. Essa modificação foi realizada após ensaios paralelos no quais ficou claro o potencial irritativo de formulações com composição mais semelhante às do grupo A.

Sabe-se que o tamanho das partículas pode variar grandemente de acordo com o sistema de tensoativo utilizado (Bouchemal et al., 2004). Ainda, dependendo do tipo de tensoativo estrutural (também chamado de composto formador da estrutura, sendo geralmente um lipídio polar ou tensoativo), seu fator de empacotamento (P, que consiste na razão entre volume da cauda hidrofóbica e área da cabeça polar multiplicada pelo tamanho da cauda), temperatura e concentração de água, diversas fases líquido-cristalinas podem também ser formadas. Utilizamos como tensoativo estrutural em todas as formulações, a fosfatidilcolina de soja, um fosfolipídio que tem tendência em formar cristais líquidos do tipo lamelar (Simões et al., 2005; Damasceno et al., 2011).

O diagrama de fases obtido para as formulações do grupo A demonstrou que com até 30% de água obtivemos a formação de um sistema característico de fase lamelar; as exceções foram as proporções 5:5 e 3:7 (m/m) com 10% de água que formaram um sistema isotrópico fluido, de uma só fase, compatível com microemulsão. A medida que aumentamos a proporção de água ocorreu a modificação do sistema formado; com 70% de água obtivemos um sistema nanoestruturado com gotículas e presença de cruz maltese, e com 80% de água obtivemos dispersões com formação apenas de gotículas. A formação de microemulsão com 10% de água é condizente com relatos da literatura; sabe-se que

a fosfatidilcolina é um tensoativo capaz de formar géis de microemulsão com baixo teor de água (Lawrence, Rees, 2012; Willmann et al., 1992). A formação de fase líquido-cristalina do tipo lamelar era esperada, pois a fosfatidilcolina tem uma forte tendência a formar esse tipo de sistema (Damasceno et al., 2011) e o Polissorbato 80 com até 20% de água forma um sistema de com presença de cruz maltese caracterizando, também, fase lamelar (Bonacucina et al., 2013).

A irritação cutânea observada com formulações semelhantes em estudos paralelos nos fizeram considerar alterações na composição, originando as formulações do grupo B. Um perfil muito semelhante de fases formadas em função do teor de água foi observado, sugerindo que a inclusão de manteiga de karitê e fitoesfingosina não impede a formação das fases nanoestruturadas. Esse resultado é condizente com a literatura, uma vez que estudos anteriores demonstraram que preparações que tinham entre seus componentes fitoesfingosina e fitoceramidas derivadas do óleo de girassol e da manteiga de karitê, formaram um sistema com fase líquido-cristalina do tipo lamelar (Oh et al., 2017).

Ao avaliarmos as características das formulações dispersas, observamos que as nanoemulsões A-70 e B-70 apresentam diâmetro das gotículas na faixa nanométrica e potencial zeta negativo (tabela 4), embora as populações não sejam monodispersas. Isso se justifica pelo fato das formulações não passarem por nenhum método para reduzir e homogeneizar o tamanho das partículas, sendo sua formação obtida apenas mediante agitação simples. A formulação A-70 apresentou tamanho das partículas ligeiramente menor, o que se deve, provavelmente, ao uso de polisorbato 80, glicerol e poloxamer, que como tensoativos, contribuem para a redução do tamanho das partículas (Shah et al. 2018).

O potencial zeta negativo na formulação A-70 pode estar relacionado a presença de polisorbato 80 como um dos tensoativos; apesar dele ser não iônico, observa-se com frequência que ele é capaz de conferir carga negativa a superfície das gotículas (Liu et al., 2006; Kong, Park, 2011). A tricaprilina também pode influenciar o potencial zeta, conferindo carga negativa, devido a presença de ácidos graxos livres, exposição dos íons da hidroxila na interface óleo em água, e desenvolvimento de ligações de hidrogênio entre esses íons e o grupo de óxidos do polisorbato (De Matos et al., 2015).

O potencial zeta indica a carga e fornece informações importantes sobre o grau de repulsão eletrostática entre cargas adjacentes: valores acima de 30 mV (em

módulo) são um indicador de estabilidade física, dificultando a agregação por repulsão elétrica (Allam et al., 2015; Kong, Park, 2011). No entanto, esse valor de potencial zeta sugerido é apenas um valor baseado em experiência e não pode ser usado como único parâmetro para prever a estabilidade da nanoemulsão, sendo o pH, a presença de tensoativos volumosos e a viscosidade, outros fatores que influenciam a estabilidade da formulação (Kong, Park, 2011). O poloxamer presente na composição das formulações do grupo A, é um outro fator que confere uma maior estabilidade à formulação dado seu volume, o que dificulta a agregação das partículas por impedimento estérico (Dumortier et al., 2006). Deve-se ressaltar, no entanto, que as formulações foram desenvolvidas para serem extemporâneas, de modo que apenas estabilidade a curto prazo é importante.

Foi realizado um estudo do potencial bioadesivo da formulação, que é a capacidade de adesão entre duas membranas biológicas ou entre uma membrana biológica e uma superfície sintética (Mathiowitz, Chickering III, Lehr, 1999; Fonseca-Santos et al., 2016). Analisando os dados do potencial de bioadesão (tabela 6), verificamos que as formulações do grupo A e B tem um comportamento bioadesivo semelhante, apresentam um trabalho de adesão 1,9 – 2,6 vezes e a força de adesão 1,2 – 1,9 vezes maior do que a água, que foi utilizada com controle no experimento. Esse resultado demonstra que as formulações apresentam potencial bioadesivo maior do que uma simples solução em água. As formulações com 20% de água possuem potencial um pouco maior que aquelas contendo 70%, o que pode ser devido à maior viscosidade. Além disso, a força de bioadesão da formulação B-20 foi superior comparado à A-20, o que também pode decorrer de sua maior viscosidade. Sabe-se que a maneira mais utilizada para aumentar o potencial bioadesivo e o tempo de residência de um fármaco tópico no sítio de aplicação é aumentando a viscosidade da formulação (Carvalho et al., 2013).

Com relação ao comportamento reológico, todas as formulações apresentaram comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico. Esse comportamento já era esperado, pois com exceção dos sistemas muito diluídos que tendem a ter característica reológica semelhante à água e apresentar comportamento newtoniano, a grande maioria das emulsões tem comportamento de fluxo não newtoniano do tipo plástico ou pseudoplástico (Florence, Attwood, Rothschild, 2011; Barnes, Hutton, Walters, 1989). A baixa viscosidade e a pseudoplasticidade apresentada pela formulação é desejável, pois facilita a aplicação tópica na pele.

Ao compararmos as formulações entre si, é possível observar que aquelas contendo 20% de água apresentaram maior viscosidade do que os sistemas com 70% de água, o que é compatível com sua estrutura lamelar e maior proporção de material graxo. Por outro lado, comparando-se sistemas com mesma quantidade de água, mas com composição de fase oleosa e tensoativo diferente, é possível também observar variações. Para os sistemas com menos água, a viscosidade associada à baixas taxas de cisalhamento é maior quando da presença de manteiga de karitê na formulação (grupo B), o que é coerente com o fato desse composto ser sólido à temperatura ambiente. Por outro lado, a sistemas contendo 70% de água, o sistema contendo manteiga de karitê é menos viscoso. Uma possível explicação é a influência do diâmetro das gotículas sobre a viscosidade (Florence, Attwood, Rothschild, 2011). Isso ocorre porque a viscosidade aumenta quando o tamanho da gotícula diminui, devido as gotículas menores serem mais rígidas (Pal, 1996); logo uma nanoemulsão com gotículas menores apresentará maior viscosidade do que uma nanoemulsão que possua populações de gotículas com tamanho maior, como no caso de B-70.

O pró-fármaco em estudo é lipofílico, de difícil solubilização em meio aquoso, além de sofrer hidrólise nesse meio, mas apesar disso, o estudo de estabilidade por 8 h demonstrou que as formulações desenvolvidas permitem que o fármaco permaneça íntegro durante o período de aplicação na pele, visto que o fármaco manteve o teor estável. Apenas a formulação A-20 apresentou uma redução no teor do fármaco, após 8 horas apresentou ~ 80% do teor inicial. As formulações do grupo B apresentaram teor sempre acima de 100%, chegando a alcançar até ~120% da concentração inicial. Esse resultado pode ter decorrido de um problema experimental em virtude da difícil solubilização do fármaco nessa formulação, o, que possivelmente prejudicou sua homogeneização.

Como objetivamos formulações extemporâneas, avaliamos também a estabilidade do pró-fármaco na mistura de tensoativo e fase oleosa por 30 dias. Constatamos que, após 7 dias, o teor encontrado corresponde a ~ 62% da concentração inicial. Surpreendentemente, após uma queda brusca na primeira semana, o teor ao redor de 62% foi mantido do 7º ao 28º quando encerramos o estudo de estabilidade. Esses resultados sugerem que o fármaco precise estar na forma liofilizada para comercialização, sendo que a formulação deve ser finalizada somente no momento da administração. Essa redução na concentração provavelmente ocorreu devido a hidrólise do pró-fármaco dexametasona-TBZ, e os novos picos que surgiram

no cromatograma a partir do 7º dia são os produtos de degradação e/ou as moléculas livres de dexametasona e TBZ. Não conseguimos explicar o fato da degradação ter ocorrido de forma pronunciada na primeira semana, mesmo sem a presença de água, e após esse período ter se mantido estável. Uma hipótese seria que algum componente da formulação catalisou essa reação de hidrólise e após ter consumido 38% do pró-fármaco a reação chegou ao estado de equilíbrio e manteve a concentração estável.

O estudo de penetração do pró-fármaco demonstrou que as formulações do grupo A não aumentaram a penetração de maneira significativa, enquanto que as do grupo B apresentaram um efeito promotor muito interessante, com diferença significativa quando comparadas ao controle. Esse aumento na penetração, localização e retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele demonstra a eficiência do nanocarreador desenvolvido para veiculação cutânea do pró-fármaco. A ausência de permeação percutânea sugeriu, inicialmente, localização cutânea do pró-fármaco. No entanto, estudos subsequentes de solubilidade e estabilidade do composto na fase receptora aquosa indicaram que a dexametasona-TBZ sofre hidrólise rapidamente, não sendo possível determinar a permeação percutânea do composto. Mas a ocorrência de permeação é sugerida pelos efeitos *in vivo* observados em modelos de psoríase (discutidos posteriormente).

Tendo em visto o aumento da penetração das formulações do grupo B, investigamos a existência de uma possível relação entre esses efeitos e alterações na função barreira da pele mediada pelas formulações. Avaliamos a perda de água transepidérmica, um parâmetro muito utilizado para avaliar a função barreira do estrato córneo, mas apenas a formulação A-20 promoveu aumento mais pronunciado neste parâmetro, sugerindo que apenas ela seja capaz de afetar a barreira cutânea, provavelmente por desorganizar o estrato córneo. No entanto, esse efeito não resultou em aumento da penetração do pró-fármaco, mas resultou em acantose, rubor e descamação *in vivo*, indicando sua capacidade de irritar a pele. O dano cumulativo da barreira cutânea por exposição repetida pode levar a irritação e até a uma dermatite de contato (Pinnagoda et al., 1990; Pinnagoda et al., 1989). Esse relato da literatura é condizente com o nosso estudo, onde a irritação na pele dos camundongos tratados com as formulações do grupo A surgiu somente a partir do terceiro dia do protocolo. Mesmo com o aumento do teor de água para 70% em A-70, a formulação ainda foi

capaz de promover acantose e rubor, e não aumentou a penetração cutânea do composto.

Já as formulações do grupo B, mesmo sem afetar a função barreira da pele, promoveram aumento da penetração do composto, o que pode indicar que seu efeito promotor independe de uma possível desorganização do estrato córneo. Possivelmente, os componentes da formulação B proporcionaram uma maior hidratação da pele, que é uma das formas de modificação do estrato córneo que pode aumentar a permeabilidade. A água é amplamente utilizada como o método mais seguro para aumentar a penetração da pele. A água adicional dentro do estrato córneo pode alterar a solubilidade do permeante, modificando a partilha do veículo para a membrana (Benson, 2005). Além disso, o aumento da hidratação da pele pode intumescer e abrir a estrutura do estrato córneo, levando a um aumento na penetração, embora isso ainda não tenha sido demonstrado experimentalmente (Benson, 2005).

A MPO é uma enzima pró-oxidativa e pró-inflamatória encontrada predominantemente em neutrófilos (cerca de 95% do MPO circulante), e o aumento dela pode causar dano ao tecido. A mensuração do nível de atividade da MPO serve como marcador de ativação de neutrófilos e monócitos (Yazici et al., 2016). Apesar da acantose induzida por formulações do grupo A principalmente, constatamos que nenhuma das formulações aumentou a atividade de MPO de maneira significativa quando comparadas ao controle. Esses resultados indicam que não houve uma ativação significativa da MPO nos camundongos, logo não houve aumento no número de neutrófilos no tecido, o que sugere que apesar de algumas formulações terem apresentado acantose, elas não induziram reações oxidativas e inflamatórias no camundongo. É possível ainda que o aumento de MPO tenha ocorrido em tempos menores, não analisados neste trabalho. Por exemplo, Nagato e colaboradores observaram aumento de atividade de MPO em pulmão de animais decorrente de hiperóxia após 24 h, sendo que após 48h, os valores encontrados foram menores, sugerindo possível retorno a valores basais com o tempo (Nagato et al., 2012).

Os parâmetros inflamatórios dos animais submetidos a indução da psoríase experimental com IMQ, como esperado, apresentaram aumento do escore de rubor e descamação de forma tempo dependente, já no 2º dia de protocolo esses escores começaram a aumentar e continuaram subindo gradativamente ao longo do tempo. No que tange o escore de rubor, a dexametsona e dexta-TBZ se mostraram eficazes

na diminuição deste parâmetro quando comparamos os camundongos do grupo psoríase; entretanto dexta-TBZ não se mostra eficaz contra a descamação, não sendo eficiente para reduzir o escore deste parâmetro. A dexametasona é eficaz na redução do escore de descamação e a dexta-ADT, que não se mostrou eficiente na redução do rubor, é eficaz na redução do escore de descamação quando comparado ao grupo psoríase. A dexametasona e dexta-TBZ se mostraram eficazes na redução da espessura da orelha do camundongo, reduzindo de forma significativa a acantose quando comparado ao grupo psoríase. Nesse parâmetro a dexta-TBZ também se mostrou mais eficiente que o ADT e dexta-ADT. O doador de H₂S ADT na dose utilizada (0,17%), não demonstrou ser eficaz na redução de nenhum dos parâmetros inflamatórios avaliados.

O experimento de avaliação do prurido espontâneo apresentou uma diferença grande no número de episódios entre os camundongos do mesmo grupo, gerando um elevado desvio padrão que prejudicou a análise estatística. Aparentemente os camundongos que utilizaram as formulações com tratamento tiveram mais episódios de coceira do que os camundongos do grupo psoríase. Isso pode ser em decorrência do efeito dos componentes da formulação sobre a pele não íntegra dos camundongos, já que após a indução com IMQ a pele fica lesada e mais sensível.

A avaliação da histologia da pele dorsal dos camundongos demonstrou a presença de acantose nos camundongos que receberam IMQ. Todos os grupos de tratamento foram eficazes e reduziram significativamente a espessura da epiderme quando comparados ao grupo psoríase. Os grupos tratados com dexametasona e dexta-TBZ se destacaram por proporcionarem uma redução maior e apresentarem uma redução significativa também quando comparado ao grupo que utilizou apenas o ADT. Apesar do ADT ter proporcionado uma redução significativa da espessura da epiderme quando comparado ao grupo psoríase, dos fármacos utilizados ele foi o que proporcionou a menor redução e parece ter um menor efeito na redução deste parâmetro.

Como esperado, os grupos tratados com dexametasona, dexta-ADT e dexta-TBZ, que é um potente corticosteróide, inibiram de forma extensiva a atividade da MPO, reduzindo significativamente quando comprado ao grupo psoríase. Isso pode significar uma diminuição do processo inflamatório e do infiltrado de neutrófilos na pele, já que a MPO é uma enzima que pode ser usada como marcador de ativação de neutrófilos e monócitos (Yazici et al., 2016). Isso já era esperado devido aos efeitos

anti-inflamatório, antiproliferativo e imunossupressor da dexametasona (Lamba, Lebwohl, 2001).

Os camundongos com psoríase experimental tiveram um aumento na quantidade de leucócitos total no sangue. Dentre os grupos de tratamento apenas o tratado com dexta-ADT promoveu uma redução significativa do número de leucócitos totais no sangue quando comparado ao grupo psoríase, redução significativa também foi constatada quando comparamos com os outros grupos de tratamento, ADT, dexametasona e dexta-TBZ. Possivelmente, o doador de H₂S ADT potencializou o efeito da dexametasona, tendo um efeito sistêmico anti-inflamatório e imunossupressor mais acentuado. Não encontramos diferença entre os percentuais dos diferentes tipos de leucócitos nos grupos tratados.

O grupo dexametasona e dexta-ADT reduziram significativamente o número de leucócitos quando comparamos com o grupo tratado com dexta-TBZ, demonstrando que possivelmente a dexametasona isolada ou acoplada ao ADT tem um maior efeito imunossupressor na medula do que a dexametasona acoplada ao TBZ. No que tange a contagem diferencial tivemos um aumento significativo do percentual de leucócitos imaturos em todos os grupos tratados, sendo que os grupos tratados com os pró-fármacos dexta-ADT e dexta-TBZ apresentaram um aumento de leucócitos imaturos mais acentuado, tendo diferença significativa inclusive quando comparado ao grupo tratado com ADT, esse maior percentual de leucócitos imaturos na medula pode significar um maior efeitos sistêmico da dexametasona acoplada a um doador de H₂S. Esses resultados sugerem que tenha ocorrido permeação percutânea dos pró-fármacos aplicados topicamente, mesmo que não tenhamos conseguido quantificação adequada na fase receptora *in vitro*, levando a efeitos sistêmicos. Como não realizamos tratamento sistêmico, não é possível comparar o efeito do pró-fármaco quando administrado na pele e sistemicamente.

A esplenomegalia não é um sintoma da psoríase, mas estudos anteriores demonstraram que este pode ser um efeito sistêmico da aplicação do IMQ utilizado para induzir a psoríase experimental (Flutter, Nestle, 2013; Schmidt, 2015). Não constatamos aumento significativo no número de esplenócitos. Como esperado, houve aumento do peso do baço nos grupos que tiveram a indução da psoríase com IMQ. Os grupos tratados com os pró-fármacos dexametasona-ADT e dexametasona-TBZ apresentaram uma redução significativa no peso do baço quando comparados ao grupo psoríase, o que possivelmente decorre de uma maior efeito sistêmico da

dexametasona quando associada ao doador de H₂S. O fato dos grupos tratados com os pró-fármacos terem reduzido significativamente o peso do baço quando comparados com o grupo tratado com dexametasona também corrobora com a hipótese de um maior efeito sistêmico da dexametasona quando associada ao doador de H₂S. O aumento do peso do baço não parece estar associado a edema, pois a variação do peso seco do baço demonstrou uma perda de peso de ~ 80% em todos os grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os resultados dos experimentos demonstram que as moléculas híbridas de dexametasona associadas a um ao doador de H₂S (dexa-TBZ e dexa-ADT) são eficazes na redução dos parâmetros inflamatórios dos animais submetidos a indução da psoríase experimental com IMQ, entretanto essa redução não apresenta diferença significativa quando comparamos ao tratamento convencional (dexametasona). Quando analisamos os efeitos apenas do doador de H₂S (ADT), ele não demonstra ser eficaz na redução de diversos parâmetro inflamatórios como rubor, descamação e atividade da MPO. Isso nos leva a propor duas hipóteses: ou o doador de H₂S (ADT) não apresenta ação na psoríase experimental induzida por imiquimode ou a dose utilizada de 0,17% (equimolar a dose de dexametasona) está abaixo da dose terapêutica.

O fato de utilizarmos uma molécula híbrida onde 1 molécula de dexametasona está acoplada a 1 molécula de doador de H₂S inviabiliza o aumento da dose, pois estaríamos aumentando também a dose da dexametasona, o que vai contra o objetivo de redução da dose para minimizar os possíveis efeitos adversos do corticoide. Duas possibilidades podem ser apresentadas para resolver este problema.

A primeira seria o uso de moléculas separadas, o que permitiria apenas o aumento da dose do doador de H₂S. No trabalho de Schmidt, 2015, que utilizou um protocolo experimental semelhante, a dose do GYY4137 (doador de H₂S de liberação lente) era de 4%, mas vale ressaltar que se tratam de moléculas diferentes, logo não podemos afirmar que o ADT a 4% seria eficaz.

A outra possibilidade seria a obtenção de uma nova molécula híbrida, que tivesse um maior número de moléculas de doador de H₂S acoplado a uma única molécula de dexametasona, aumentaríamos assim a concentração apenas do doador de H₂S mantendo estável a dose de dexametasona. Isso implicaria em uma molécula maior e talvez com um logP mais elevado, dificultando assim a penetração nas camadas viáveis da pele, mas estratégias de promoção de penetração como o

sistema nanoestruturado desenvolvido neste estudo poderia superar esse problema e fazer a entrega do pró-fármaco.

7.0 CONCLUSÕES

As formulações foram desenvolvidas com êxito e capazes de incorporar o fármaco até 1%, mantendo a concentração estável por 8 horas, com exceção de A-20.

Apenas a formulação A-20 aumentou a perda de água transepidermica quando comparada ao controle, indicando que somente esta formulação foi capaz de alterar a função barreira do estrato córneo. Mesmo alterando a função barreira, as formulações do grupo A não foram capazes de aumentar a penetração do pró-fármaco. As formulações do grupo B apresentaram maior eficiência na entrega e retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele.

As formulações do grupo A demonstraram potencial irritativo, apresentando rubor, descamação e acantose na pele dorsal do camundongo. Animais tratados com B-20 não apresentaram rubor e descamação, apenas pequeno grau de acantose.

O dexta-TBZ tem baixa solubilidade em meio aquoso e sofre hidrólise quando incorporado na solução de fase oleosa e tensoativo, sugerindo que, para manter a estabilidade da molécula, é necessário a apresentação na forma de pó liofilizado para ser incorporado na formulação apenas no momento da administração.

Os pró-fármacos dexta-TBZ e dexta-ADT apresentaram um maior efeito sistêmico quando comparados à dexametasona, indicando uma maior absorção percutânea (ou transdérmica).

Os pró-fármacos dexta-TBZ e dexta-ADT são eficazes na redução dos parâmetros inflamatórios nos camundongos com psoríase induzida por imiquimode, mas os efeitos demonstrados são similares à dexametasona, não promovendo potencialização dos efeitos anti-inflamatórios.

REFERÊNCIAS ¹

ALLAM, Ahmed N. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of curcumin self-nano phospholipid dispersion as an approach to enhance oral bioavailability. **International journal of pharmaceutics**, v. 489, n. 1, p. 117-123, 2015.

ALSHORAF, Ammar KH et al. Psoriasis is associated with low serum levels of hydrogen sulfide, a potential anti-inflammatory molecule. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 228, n. 4, p. 325-332, 2012.

AZULAY, David Rubem; AZULAY, David Rubens; AZULAY-ABULAFIA, Luna. **Dermatologia**. 6. ed., rev. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

BARNES, Howard A.; HUTTON, John Fletcher; WALTERS, Kenneth. **An introduction to rheology**. Elsevier, 1989.

BENSON, Heather AE. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. **Current drug delivery**, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2005.

BERNARDI, Daniela S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 44, 2011.

BEYER, Vivianne; WOLVERTON, Stephen E. Recent trends in systemic psoriasis treatment costs. **Archives of dermatology**, v. 146, n. 1, p. 46-54, 2010.

BOEHNCKE, Wolf-Henning. Etiology and pathogenesis of psoriasis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 41, n. 4, p. 665-675, 2015.

BOUCHEMAL, Kawthar et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.

BONACUCINA, Giulia et al. Characterization of ternary phase diagrams by means of thermal and rheological analyses. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 39, n. 10, p. 1547-1554, 2013.

CARVALHO, Flávia Chiva et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, Flávia Chiva et al. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2013.

1 - De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

CARVALHO, Vanessa F. et al. Potential of non-aqueous microemulsions to improve the delivery of lipophilic drugs to the skin. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, p. 1-11, 2016.

CASTELA, E. et al. Topical corticosteroids in plaque psoriasis: a systematic review of risk of adrenal axis suppression and skin atrophy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. s3, p. 47-51, 2012.

CASTELA, E. et al. Topical corticosteroids in plaque psoriasis: a systematic review of efficacy and treatment modalities. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, p. 36-46, 2012b.

CEVC, Gregor; BLUME, Gabriele. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1663, n. 1, p. 61-73, 2004.

CHORILLI, Marlus et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev bras farm**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, Marlus et al. Ensaio biológico para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, p. 19-30, 2009.

CICHEWICZ, Allie et al. Cutaneous delivery of α -tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 817-826, 2013.

COAVOY-SÁNCHEZ, S. A. et al. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. **Pharmacological research**, v. 113, p. 686-694, 2016.

CUNHA, Thiago M. et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European journal of pharmacology**, v. 590, n. 1, p. 127-135, 2008.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 9-18, 2011.

DANBY, Simon G. et al. Effect of olive and sunflower seed oil on the adult skin barrier: implications for neonatal skin care. **Pediatric dermatology**, v. 30, n. 1, p. 42-50, 2013.

DE MATTOS, Cristiane Bastos et al. Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 5529, 2015.

DEVAUX, S. et al. Topical vitamin D analogues alone or in association with topical steroids for psoriasis: a systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. s3, p. 52-60, 2012.

DONG, Yao-Da et al. Understanding the interfacial properties of nanostructured liquid crystalline materials for surface-specific delivery applications. **Langmuir**, v. 28, n. 37, p. 13485-13495, 2012.

DOS SANTOS, Orlando David Henrique; DA ROCHA-FILHO, Pedro Alves. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 543-549, 2007.

DRUMMOND, Calum J.; FONG, Celesta. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 4, n. 6, p. 449-456, 1999.

DUMORTIER, Gilles et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

EKUNDI-VALENTIM, E. et al. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 7, p. 1463-1474, 2010.

EKUNDI-VALENTIM, Eduardo et al. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. **Medical gas research**, v. 3, n. 1, p. 24, 2013.

ELIAS, Peter M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, 1983.

ESPAÑOL MARIÑO, Laura Victoria. **Aplicação da eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2015.

EZRAHI, Shmaryahu; ASERIN, Abraham; GARTI, Nissim. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. **Handbook of microemulsion science and technology**. New York: Informa Inc, p. 185-246, 1999.

FONSECA-SANTOS, Bruno et al. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4553, 2016.

FORMARIZ, Thalita Pedroni et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

FLORENCE, Alexander Taylor; ATTWOOD, David; ROTHSCHILD, Zuleika. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

FLUTTER, Barry; NESTLE, Frank O. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. **European journal of immunology**, v. 43, n. 12, p. 3138-3146, 2013.

GABBANELLI, Susana; DRAZER, German; KOPLIK, Joel. Lattice Boltzmann method for non-Newtonian (power-law) fluids. **Physical review E**, v. 72, n. 4, p. 046312, 2005.

GILLERON, L. et al. Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the Draize eye irritation test. **Toxicology in vitro**, v. 11, n. 5, p. 641-644, 1997.

HATHOUT, Rania M. et al. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 188-196, 2010.

HERWADKAR, Anushree et al. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. **International journal of pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 289-296, 2012.

HON, K. L. et al. Patient acceptability, efficacy, and skin biophysiology of a cream and cleanser containing lipid complex with shea butter extract versus a ceramide product for eczema. **Hong Kong Med J**, v. 21, n. 5, p. 417-25, 2015.

HOSMER, Jaclyn M.; STEINER, Alexandre A.; LOPES, Luciana B. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: impact of the monoglyceride. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 3, p. 694-706, 2013.

IKOKU, Chi U.; RAMEY, Henry J. **Transient flow of non-Newtonian power-law fluids in porous media**. Dept. of Energy, 1978.

JAFARI, Seid Mahdi et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1191-1202, 2008.

KIM, Whan B.; JEROME, Dana; YEUNG, Jensen. Diagnosis and management of psoriasis. **Canadian Family Physician**, v. 63, n. 4, p. 278-285, 2017.

KIRCIK, Leon H.; ZOGRAFOS, Panagiotis. The Power of Combination Topical Therapy for Psoriasis. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 14, n. 10, p. 1113-1116, 2015.

KONG, Ming; PARK, Hyun Jin. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. **Carbohydrate polymers**, v. 83, n. 3, p. 1303-1310, 2011.

KRAVVAS, Georgios; GHOLAM, Karolina. Use of topical therapies for pediatric psoriasis: a systematic review. **Pediatric dermatology**, v. 35, n. 3, p. 296-302, 2018.

KREILGAARD, Mads. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S77-S98, 2002.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. suppl 2, p. ii30-ii36, 2005.

KUDLA, Petra et al. Phase behavior of liquid–crystalline emulsion systems. **Journal of colloid and interface science**, v. 349, n. 2, p. 554-559, 2010.

LAMBA, S.; LEBWOHL, M. Combination therapy with vitamin D analogues. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. s58, p. 27-32, 2001.

LAWRENCE, M. Jayne; REES, Gareth D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 175-193, 2012.

LEHR, Claus-Michael. Lectin-mediated drug delivery:: The second generation of bioadhesives. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1-2, p. 19-29, 2000.

LI, Ling; ROSE, Peter; MOORE, Philip K. Hydrogen sulfide and cell signaling. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 51, p. 169-187, 2011.

LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily; SANTIAGO, Juan Luis. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 70, 2017.

LIU, Weirong et al. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of colloid and interface science**, v. 303, n. 2, p. 557-563, 2006.

LOPES, Luciana 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. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 146-155, 2006.

LOPES, Luciana B.; COLLETT, John H.; BENTLEY, M. Vitória LB. Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 25-30, 2005.

LOPES, Luciana B.; MURPHY, Neal; NORNOO, Adwoa. Enhancement of transdermal delivery of progesterone using medium-chain mono and diglycerides as skin penetration enhancers. **Pharmaceutical development and technology**, v. 14, n. 5, p. 524-529, 2009.

LOPES, Luciana B. et al. Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1346-1357, 2010.

LOWICKA, Ewelina; BEŁTOWSKI, Jerzy. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacological reports: PR**, v. 59, n. 1, p. 4-24, 2006.

MASON, Anne R. et al. Topical treatments for chronic plaque psoriasis. **Cochrane database of systematic reviews.**, n. 3, 2013.

MATHIOWITZ, Edith; CHICKERING III, Donald E.; LEHR, Claus-Michael. **Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development**. CRC Press, 1999.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MROWIETZ, Ulrich et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. **Archives of dermatological research**, v. 303, n. 1, p. 1-10, 2011.

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

NAGATO, Akinori C. et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. **International journal of experimental pathology**, v. 93, n. 4, p. 269-278, 2012.

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of disease Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;(361):496-509.

OGISO, Taro; IWAKI, Masahiro; PAKU, Tsuyoshi. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 84, n. 4, p. 482-488, 1995.

OH, Myoung Jin et al. Novel phytoceramides containing fatty acids of diverse chain lengths are better than a single C18-ceramide N-stearoyl phytosphingosine to improve the physiological properties of human stratum corneum. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 10, p. 363, 2017.

PAL, Rajinder. Effect of droplet size on the rheology of emulsions. **AIChE Journal**, v. 42, n. 11, p. 3181-3190, 1996.

PARISI, Rosa et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 377-385, 2013.

PEPE, Dominique et al. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **International journal of pharmaceutics**, v. 434, n. 1, p. 420-428, 2012.

PEPE, Dominique et al. Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 102, n. 5, p. 1476-1487, 2013.

PORRAS, M. et al. Studies of formation of W/O nano-emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, n. 1-3, p. 115-118, 2004.

PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M.; JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

PINNAGODA, Jaliya et al. Prediction of susceptibility to an irritant response by transepidermal water loss. **Contact Dermatitis**, v. 20, n. 5, p. 341-346, 1989.

PINNAGODA, J. et al. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. **Contact dermatitis**, v. 22, n. 3, p. 164-178, 1990.

RAPP, Stephen R. et al. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 41, n. 3, p. 401-407, 1999.

RODRIGUES, L et al. The slow-releasing hydrogen sulphide donor, GYY4137, exhibits novel anti-skin symptoms of psoriasis and related itch. Nitric Oxide, Volume 47, Supplement, 1 May 2015, Page S35, ISSN 1089-8603. 3rd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, 2015, Athens. Greece. 3rd-6th May 2015.

RODRIGUES, L. et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 255-266, 2017.

SBD – Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso Brasileiro de Psoríase 2012.

SCHMIDT, Tuanny Priscila. **Avaliação farmacológica de uma nanodispersão contendo GYY4137 (doador de liberação lenta de H₂S) na psoríase experimental**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2015.

SCHON, Michael P.; BOEHNCKE, Wolf-Henning. **Psoriasis**. N Engl J Med 2005;352:1899–912.

SCHWARZ, Joseph S.; WEISSPAPIR, Michael R.; FRIEDMAN, Doron I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 5, p. 687-692, 1995.

SHAH, Ankita et al. Effect of different polysorbates on development of self-microemulsifying drug delivery systems using medium chain lipids. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2018.

SHAI, Avi; BARAN, Robert; MAIBACH, Howard I. **Handbook of cosmetic skin care**. Informa UK Ltd., Second Edition, p. 34-40, 2009.

SILVA, José Alexandre da et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **J Basic App Pharm Sci**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SIMOES, S. I. et al. Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Polissorbato 80. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 26, n. 3, p. 307-317, 2005.

SKOLOVÁ, Barbora et al. Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 5, p. 824-834, 2017.

SMYTH, Hugh DC; BECKET, Gordon; MEHTA, Samir. Effect of permeation enhancer pretreatment on the iontophoresis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) through human epidermal membrane (HEM). **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 5, p. 1296-1307, 2002.

STEWART, Mary Ellen; DOWNING, Donald Talbot. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 8, p. 1434-1439, 1999.

SZEPIETOWSKI, J. C.; REICH, A. Pruritus in psoriasis: an update. **European Journal of Pain**, v. 20, n. 1, p. 41-46, 2016.

SUN, Yun et al. Metabolic changes of H₂S in smokers and patients of COPD which might involve in inflammation, oxidative stress and steroid sensitivity. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

TANGSO, Kristian 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 applied materials & interfaces**, v. 6, n. 15, p. 12363-12371, 2014.

THOMAS, Siji et al. Stability, Cutaneous Delivery, and Antioxidant Potential of a Lipoic Acid and α -Tocopherol Codrug Incorporated in Microemulsions. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 8, p. 2530-2538, 2014.

TORSEKAR, R.; GAUTAM, Manjyot M. Topical therapies in psoriasis. **Indian dermatology online journal**, v. 8, n. 4, p. 235, 2017.

VERMA, Nandini et al. Anti-Inflammatory effects of shea butter through inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the Nf-Kb pathway in LPS-activated J774 macrophage cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2012.

WANG, Lijuan et al. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of colloid and interface science**, v. 330, n. 2, p. 443-448, 2009.

WANG, Rui. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. **Physiological reviews**, v. 92, n. 2, p. 791-896, 2012.

WHITEMAN, Matthew et al. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 10, p. 1147-1154, 2010.

WILLIMANN, Haus et al. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 81, n. 9, p. 871-874, 1992.

WILLIAMS, Adrian C.; BARRY, Brian W. Penetration enhancers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 128-137, 2012.

WINDHAB, Erich J. et al. Emulsion processing—from single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 8-9, p. 2101-2113, 2005.

YAZICI, Cevat et al. A novel approach in psoriasis: first usage of known protein oxidation markers to prove oxidative stress. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 3, p. 207-212, 2016.