



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e triptolida no tratamento tópico da psoríase

Ana Vitória Pupo Silvestrini

Ribeirão Preto
2020



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina
como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e triptolida no
tratamento tópico da psoríase**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Ana Vitória Pupo Silvestrini

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Vitória Lopes Brada Bentley

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação no dia 05/02/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto, SP

2020

SIL VESTRINI,
A. V. P.

Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e triptolida no tratamento tópico da psoríase

MESTRADO
FCFRP USP
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silvestrini, Ana Vitória Pupo Silvestrini

Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e triptolida no tratamento tópico da psoríase. Ribeirão Preto, 2020.

167 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Nanodispersão líquido cristalina. 2. Psoríase. 3. Terapia gênica. 4. Triptolida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Vitória Pupo Silvestrini

Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e Triptolida no tratamento tópico da psoríase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais por todo amor e incentivo; e aos meus professores por me ensinarem o prazer do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus mentores espirituais e anjos protetores pela oportunidade de estar aqui, neste plano espiritual, contribuindo para a evolução do meu espírito e de meus companheiros e para o esclarecimento de minha existência.

À minha família, especialmente, aos meus pais, **Fátima e Eugênio**, às minhas irmãs, **Camila e Mariana**, aos meus cunhados **Vidal e André**, por todo incentivo, apoio e amor nesta jornada. Ao **Arthur**, meu namorado, pela compreensão, carinho e estímulo a todos os momentos desta minha jornada. E às minhas companheiras de quatro patas, **Nina** (*in memoriam*), **Nininha**, **Brigitte** e, em especial, **Margot**, por ser um ser de luz e de amor puro e incondicional em minha vida.

Aos meus avós (*in memoriam*), especialmente, à minha avó **Rosa** e ao meu tio **José Vitório**, por me protegerem, me guiarem e propagarem em mim a energia espiritual para o caminho da luz e sabedoria divina.

Especialmente à minha orientadora **Prof. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley**, por me acolher em seu laboratório e ao grupo de pesquisa “NanoGeneSkin”, pela confiança depositada, pelo exemplo profissional e pessoal, pelo conhecimento compartilhado e pelas oportunidades proporcionadas.

Aos meus professores **Dr. Maurício Ventura Mazzi** e **Dr. Thiago Antônio Moretti de Andrade** por todo incentivo, por todo conhecimento compartilhado até hoje, por serem meus exemplos de professores e pesquisadores, e os responsáveis por me incentivarem a almejar a carreira acadêmica e acreditar em meu potencial.

Aos técnicos e também amigos do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica: **Dra. Fabíola Silva Garcia Praça**, por me receber com todo carinho, por contribuir grandiosamente em meus experimentos e por ter me apoiado e estimulado durante esta jornada; **José Orestes Del Ciampo**, **Henrique Diniz** e **Angela Luisa Doreto** pela convivência esplêndida, carinho e por estarem sempre disponíveis para me auxiliarem nos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório: **Dr. Angelo Caron, Ms. Juliana Rosa, Dra. Juliana Abriata, Ms. Livia de Queiroz, Ms. Marcela Tavares, Sofia Pasian e Ualisson da Silva** pela convivência e por terem compartilhado comigo toda a experiência científica e pessoal.

À **Prof. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini** e ao técnico **Arnaldo Gomes de Oliveira Filho** do Laboratório de Fluídos Complexos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo pela recepção e pelas análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo realizadas.

Ao **Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade**, à técnica **Maria Aparecida Nunes Ferreira** (“Cici”) e ao **Ms. Marcel Nani Leite** do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar meus experimentos, pela recepção e por todo conhecimento compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Osvaldo de Freitas**, à técnica **Dra. Máira Peres Ferreira Duarte** e à aluna **Ana Clara Wada de Carvalho** do Laboratório de Farmacotécnica pela oportunidade de realizar os ensaios de reologia e análise do perfil de textura, pela recepção e por todo conhecimento compartilhado.

Ao técnico **Dr. Eduardo Tozatto**, do Laboratório de Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares da FCFRP-USP pelos serviços prestados com as análises de microscopia confocal.

À técnica **Fabiana Rossetto de Moraes** do Laboratório de Imunologia da FCFRP-USP pelas análises de citometria de fluxo realizadas.

À técnica **Dra. Ivana Aparecida Borin** do Laboratório de Microscopia de Força Atômica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelas análises realizadas.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas e da Pós-Graduação:
Nilva Aparecida Afonso Ruggiero, Vanessa Justino, Eleni Angeli Passos e Henrique Theodoro pelos serviços prestados.

À **Karina M. Stefani**, secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela disposição e ajuda prestados.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº. 2018/08253-9).

E, por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, participaram da execução deste trabalho, tornando possível a sua realização.

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

*“Nothing great was ever achieved without
enthusiasm.” _Ralph Waldo Emerson*

RESUMO

SILVESTRINI, A.V.P. **Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e triptolida no tratamento tópico da psoríase.** 2020. 163 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, que pode acometer a pele, unhas, mucosas e articulações. A sua ocorrência está associada à uma complexa interação entre fatores genéticos, metabólicos, imunológicos e ambientais. O tratamento convencional é baseado na sua gravidade, sendo recomendado o uso de imunossuppressores, foto- ou quimiofototerapia e imunobiológicos. No entanto, a terapia a longo prazo é limitada. Neste contexto, a busca de novos agentes terapêuticos é alvo constante de pesquisas e necessária para melhorar as condições clínicas dos pacientes. Desta forma, foi proposto a entrega combinada de dois agentes farmacológicos, triptolida e *small interfering RNA* (siRNA) com alvo o TNF- α , veiculados por nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs), que são sistemas que apresentam características vantajosas para a aplicação tópica de fármacos, devido a sua arquitetura ordenada, biocompatibilidade com membranas biológicas, e são passíveis de modificações químicas e físicas, permitindo maior multifuncionalidade. Neste sentido, as NLCs foram produzidas e caracterizadas quanto às suas propriedades físicas, químicas e funcionais *in vitro*. A modificação com poli-(alilamina hidrocloreto) (PAH), agente catiônico, forneceu carga residual positiva ao sistema, permitindo maior interação eletrostática com o siRNA. As partículas apresentaram tamanho hidrodinâmico médio ≤ 160 nm, índice de polidispersão $\leq 0,2$ e uma eficiência de encapsulação $\geq 90\%$. A presença do PAH, triptolida ou siRNA não alteraram a mesoestrutura líquido-cristalina hexagonal. As NLCs apresentaram estabilidade física e química por pelo menos 90 dias armazenadas a 25 °C. Estudos cinéticos mostraram que as NLCs apresentam maior retenção na região da epiderme e derme viável, com uma maior entrega das moléculas ativas quando foi aplicado um hidrogel de hidroxietilcelulose contendo as NLCs. Dados reológicos mostraram que o aumento da viscosidade da formulação melhorou as características pseudoplásticas e o perfil de textura. *In vitro*, a presença do PAH e da triptolida conferiram toxicidade às NLCs, ainda que, os efeitos tóxicos da triptolida foram atenuados com a encapsulação ao sistema. A rápida internalização celular, com taxas acima de 80% em 6 h de tratamento, foi atribuída aos mecanismos de endocitose mediada por caveolina e macropinocitose. Durante o tráfico intracelular, foi observado uma diminuição da localização endo-lisossomal das NLCs após 6 h, resultando em escape endossomal e liberação efetiva de seu conteúdo. Em cultura de monócitos primários humanos a co-entrega de triptolida e siRNA-TNF pelas NLCs mostrou atenuar a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1, após tratamento concomitante ou com prévia exposição ao lipopolissacarídeo. Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que as NLCs multifuncionais desenvolvidas é uma estratégia relevante para a administração tópica desses agentes para o tratamento da psoríase e outras condições cutâneas de ordem inflamatória ou autoimune.

Palavras chaves: nanodispersão líquido-cristalina, psoríase, terapia gênica, triptolida.

ABSTRACT

SILVESTRINI, A.V.P. **Development and characterization of phase liquid-crystalline nanodispersion as a multifunctional carrier system of TNF- α siRNA and triptolide in the topical treatment of psoriasis.** 2020. 163 f. Dissertation (Master). College of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Psoriasis is a chronic inflammatory disease that can affect the skin, nails, mucous membranes and joints. Its occurrence is associated with a complex interaction between genetic, metabolic, immunological and environmental factors. Conventional treatment is based on its severity, and the use of immunosuppressants, photo- or chemophototherapy and immunobiologicals is recommended. However, long-term therapy is limited. In this context, the search for new therapeutic agents is a constant target for research and necessary to improve the clinical conditions of patients. Thus, it was proposed the combined delivery of two pharmacological agents, triptolide and small interference RNA (siRNA) targeting TNF- α , carried by liquid-crystalline nanodispersions (LCNs), which are systems that have advantageous characteristics for the topical application of drugs, due to their orderly architecture, biocompatibility with biological membranes, and are subject to chemical and physical modifications, allowing greater multifunctionality. In this sense, LCNs were produced and characterized in terms of their physical, chemical and functional properties *in vitro*. The modification with poly(allylamine hydrochloride) (PAH), a cationic agent, provided a positive residual charge to the system, allowing greater electrostatic interaction with the siRNA. The particles had an average hydrodynamic size ≤ 160 nm, polydispersion index ≤ 0.2 and an encapsulation efficiency $\geq 90\%$. The presence of PAH, triptolide or siRNA did not alter the hexagonal liquid-crystalline mesostructure. The LCNs showed physical and chemical stability for at least 90 days stored at 25 °C. Kinetic studies have shown that LCNs have greater retention in the region of the epidermis and viable dermis, with greater release of the active molecules when a hydroxyethylcellulose hydrogel containing NLCs is applied. Rheological data showed that the increased viscosity of the formulation improved the pseudoplastic characteristics and the texture profile. *In vitro*, the presence of PAH and triptolide conferred toxicity to the LCNs, although the toxic effects of triptolide were attenuated with the encapsulation of the system. Rapid cell internalization, with rates above 80% in 6 h of treatment, was attributed to mechanisms of caveolin-mediated endocytosis and macropinocytosis. During intracellular trafficking, a decrease in the endo-lysosomal location of LCNs was observed after 6 h, resulting in endosomal escape and effective release of their content. In culture of primary human monocytes, the co-delivery of triptolide and siRNA-TNF by LCNs has been shown to attenuate the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and TGF- β 1, after concomitant treatment or with previous exposure to lipopolysaccharide. In view of the results obtained, it can be concluded that the multifunctional LCNs developed are a relevant strategy for the topical administration of these agents for the treatment of psoriasis and other skin conditions of an inflammatory or autoimmune.

Keywords: liquid-crystalline nanodispersions, psoriasis, gene therapy, triptolide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Aspectos histológicos da pele normal e psoriática.**2
- Figura 2 - Imunopatogênese da psoríase.**.....3
- Figura 3 - Histórico de desenvolvimento da terapêutica com RNAi.**9
- Figura 4 - Mecanismo de silenciamento mediado por siRNA. [A] Estrutura siRNA. [B] Processo de silenciamento gênico.**..... 11
- Figura 5 - Estrutura química da triptolida.** 15
- Figura 6 - Principais mesofases líquido-cristalinas liotrópicas.** Parâmetro crítico de empacotamento e a morfologia agregada resultante de acordo com a curvatura interfacial: CCP < 1 para tipo I, CPP = 1 para plano lamelar e CPP > 1 para estruturas do tipo II.20
- Figura 7 - Representação ilustrativa do processo de análise do perfil de textura. [A] A prova cilíndrica fixada no equipamento após a calibração (1) é movida em direção à formulação (2) a uma velocidade de 1 mm/s, durante 10 s, em seguida a prova cilíndrica é movida para cima (2 mm/s) até a ruptura entre a formulação e a prova (3). [B] Curva típica obtida para a análise do perfil de textura.**.....40
- Figura 8 - Representação ilustrativa do analisador de textura para análise de bioadesividade.** A prova cilíndrica (seta vermelha), contendo a amostra (seta amarela), fixada no equipamento após a calibração é movida em direção à membrana biológica (seta verde) a uma velocidade de 1 mm/s, durante 10 s, em seguida a prova cilíndrica é movida para cima (1 mm/s), até a ruptura entre a formulação e a membrana.41
- Figura 9 – Representação ilustrativa da célula vertical de difusão de Franz e os ensaios de permeação e retenção cutâneas. [A] Componentes que compõem a célula vertical de difusão. [B] Camadas da pele como referência a pele de orelha de porco dermatomizada a 500 µm utilizada nos ensaios, e a localização das NLCs em cada ensaio: (1) fração do EC e (2) fração epiderme-derme obtidas pela técnica de *tape-stripping*; e em (3) conteúdo permeado determinado no compartimento receptor. [C] Técnica de *tape stripping* e extração da triptolida presente na fração tecidual do EC e na fração da EP+D para quantificação utilizando CLAE UV-Vis.**45
- Figura 10 - Representação ilustrativa da obtenção e cultivo das células primárias humanas. [A] Coleta e centrifugação do sangue venoso para separação da fração contendo os leucócitos dos demais componentes sanguíneos (plasma, plaquetas e hemácias); [B] o pellet de células ressuspenso em meio RPMI-1640 e submetido a contagem em câmara de Neubauer em microscópio; e [C] Diluição a 3×10^6 células/mL da suspensão de células em meio RPMI-1640 contendo 2,5%**

- de SBF. Após 2 h as células não-aderidas são retiradas, e as células aderidas são mantidas em cultivo (monócitos).48
- Figura 11 - Protocolos experimentais para avaliação da eficácia terapêutica em monócitos primários humanos.54**
- Figura 12 - Perfil cromatográfico do método analítico em CLAE para determinação de triptolida. [A]** Cromatogramas referentes à seletividade do método analítico: **[1]** fase móvel; **[2]** tampão fosfato de sódio (0,01 M; pH 7,0); **[3]** formulação de estudo e **[4]** pele triturada e homogeneizada em acetonitrila. **[B]** Cromatograma representativo da concentração de triptolida a 12,5 µg/ mL.58
- Figura 13 - Perfil cromatográfico e análise estatística da linearidade do método analítico. [A]** Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a curva analítica em concentrações de 0,1 a 12,5 µg/mL. **[B]** Representação gráfica da regressão linear obtida para a curva analítica (equação da reta $y = 167898x - 620,56$ e $R^2 = 0,9999$). **[C]** Perfil de distribuição residual de triptolida obtida pelo teste de Durbin Watson.....60
- Figura 14 - Fotomicroscopias representativas obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas líquido-cristalinos após 24 h de equilíbrio. [A]** Sistema líquido cristalino sem PAH; **[B-H]** sistema líquido-cristalino com diferentes concentrações de PAH (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0/ 1,5; e 2,0 %, respectivamente). **[I]** Sistema líquido-cristalino com 0,04% de triptolida. **[J]** Sistema líquido-cristalino com 0,5% de PAH e 0,04% de triptolida. Objetiva de 32x, temperatura 25°C.....66
- Figura 15 - Perfil eletroforético representativo do siRNA em gel de agarose. [A]** Avaliação da eficiência de complexação das NLCs. **[B]** Avaliação da liberação e integridade do siRNA liberado das NLCs após competição com heparina. Controle positivo: siRNA 5 µM. Controles negativos: diluente (água isenta de RNase), NLC, heparina, heparina com siRNA 5 µM e heparina com NLC. Visualização em luz UV e aquisição de imagens pelo software QualityOne.70
- Figura 16 - Sobreposição dos perfis de espalhamento obtidos por SAXS das NLCs. [A]** NLC sem PAH, com PAH e com siRNA 5 µM. **[B]** NLC TP sem PAH, com PAH e com siRNA 5 µM. **[C]** NLC e NLC em hidrogel de HEC 1%. **[D]** NLC TP e NLC TP em hidrogel de HEC 1%.72
- Figura 17 - Representação esquemática da mesoestrutura hexagonal reversa e influência de aditivos na estrutura. [A]** NLC hexagonal reversa, arranjo hexagonal reverso e representação do parâmetro de rede (α). Células unitárias do arranjo hexagonal reverso na presença dos aditivos **[B]** PAH, **[C]** PAH e triptolida e **[D]** PAH, triptolida e siRNA.75
- Figura 18 - Representação gráfica dos dados de estabilidade física e química das NLCs sob diferentes condições de armazenagem durante um período de 90 dias.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, polidispersão e

potencial zeta para [A-B] NLC e para NLC TP [C-D]. Conteúdo de triptolida encapsulado nas NLC-TP [E]. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01 e * p < 0,05).76

Figura 19 - Reogramas referentes às variações de viscosidades aparentes e tensões de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. [A] Hidrogel puro; [B] TP-Hidrogel; [C] Hidrogel contendo NLC; e [D] Hidrogel contendo NLC-TP. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 formulações independentes).79

Figura 20 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a análise do perfil de textura dos hidrogéis. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 formulações independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01 e * p < 0,05).82**

Figura 21 - Representação gráfica da bioadesividade dos hidrogéis em membrana suína. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (* p < 0,001 e ** p < 0,01).84**

Figura 22 - Fotomicroscopias bidimensionais (de fase) representativas obtidas por AFM das NLCs. [A] NLC; e [B] NLC TP. Escalas de 1 μ m, 500 nm e 200 nm.85

Figura 23 - Fotomicroscopias tridimensionais representativas e histograma obtidos por AFM das NLCs. [A] NLC; e [B] NLC TP.86

Figura 24 - Perfil de liberação da triptolida em membrana sintética de celulose utilizando célula vertical de difusão de Franz. Ensaio realizado com triptolida em solução (propilenoglicol:água, 1:5, v/v), triptolida incorporada no hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 μ g). Os dados do conteúdo liberado são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (* p < 0,0001).88**

Figura 25 - Perfil de permeação da triptolida em pele de orelha suína utilizando célula vertical de difusão de Franz. Ensaio realizado com TP-solução, TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 μ g). Os dados do conteúdo permeado são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós-teste de Tukey (p < 0,0001): # = NLC TP vs TP-solução, TP-hidrogel e NLC TP-hidrogel; & = solução vs TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel; e @ = NLC TP-hidrogel vs TP-hidrogel.91

Figura 26 - Perfis de retenção da triptolida em pele de orelha suína. Ensaio realizado com TP-solução, TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 μ g). Os dados do

conteúdo retido no EC e na EP+D são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).94

Figura 27 - Fotomicroscopias representativas de cortes histológicos de pele de orelha suína obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após 6 h de tratamento. Ensaio realizado com amostras contendo siRNA-Alexa Fluor 647 5 μ M livre (água isenta de RNase) e NLC TP-siRNA Alexa Fluor 647 5 μ M. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC TP). A barra de escala corresponde a 100 μ m.96

Figura 28 - Representação gráfica da viabilidade celular obtidas pelo ensaio de resazurina para a linhagem HaCaT. Porcentagem de viabilidade celular após 24 h de tratamento. Controle negativo: meio de cultura DMEM 10% SBF. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=8).98

Figura 29 - Eficiência de internalização celular das NLC TP em HaCaT. Representação gráfica da porcentagem de internalização celular das NLC TP obtidas por citometria de fluxo após os diferentes tempos de tratamento. Controle positivo de transfecção: lipofectamina 2000® -siRNA Alexa Fluor 647. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por teste *t* de Student (* $p < 0,0001$: NLC TP-siRNA vs siRNA). 101

Figura 30 - Fotomicroscopias representativas da captação celular das NLCs em HaCaT obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após 24 h de tratamento. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular), Rodamina 123 (λ 552 nm; marcador membrana mitocondrial) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC). Controle positivo de transfecção: lipofectamina 2000®; controle negativo: meio DMEM suplementado com 10% SBF. A barra de escala corresponde a 20 μ m. 102

Figura 31 - Internalização celular das NLCs na presença de diferentes inibidores de endocitose. Representação gráfica da porcentagem da internalização celular após 6h de tratamento com as NLCs na ausência (controle positivo) e na presença dos inibidores de endocitose. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3). Análise estatística realizada por teste *t* de Student (* $p < 0,001$ em relação ao controle positivo)..... 105

Figura 32 - Coeficiente de Pearson (r) e coeficientes de Mander (M₁ e M₂) para os diferentes tempos de tratamento. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5 campos para cada réplica independente [n=3]). Análise estatística realizada por Two-way ANOVA, pós teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$; e*** $p < 0,0001$). 108

- Figura 33 - Fotomicroscopias representativas do tráfico intracelular das NLCs em HaCaT obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após os diferentes tempos de tratamento.** Células tratadas com NLCs-siRNA Alexa Fluor 647 por **[A]** 1 h; **[B]** 6 h e **[C]** 24 h. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular), LysoTracker Green (λ 511 nm; marcador endossomos/lisossomos) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC). A barra de escala corresponde a 20 μ m. 109
- Figura 34 - Viabilidade celular da cultura de monócitos/ macrófagos primários humanos submetidos à exposição com LPS e aos tratamentos.** **[A]** LPS e tratamentos concomitantes por 48 h. **[B]** LPS por 24 h iniciais e tratamentos por mais 24 h. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes). 112
- Figura 35- Perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos/macrófagos primários humanos submetidos à exposição concomitante de LPS e tratamentos por 48 h.** Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$)... 113
- Figura 36 - Perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos/macrófagos primários humanos submetidos à exposição inicial com LPS por 24 h, seguido dos tratamentos por 24 h.** Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$)..... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas carreadores nanoestruturados para veiculação de triptolida	18
Tabela 2 - Inibidores de endocitose: mecanismos e concentrações avaliadas.	51
Tabela 3 - Análise da precisão e da exatidão intra- e inter-dia.....	61
Tabela 4 - Representação dos dados para o teste de recuperação.....	62
Tabela 5 - Representação dos dados para a análise de robustez.....	63
Tabela 6 - Avaliação das diferentes concentrações de PAH.....	65
Tabela 7 - Dados físico-químicos de caracterização das NLCs.	67
Tabela 8 - Dados obtidos por análise de SAXS.	73
Tabela 9 - Coeficiente de correlação (R^2) para os diferentes modelos matemáticos.....	80
Tabela 10 - Parâmetros reológicos de acordo com o modelo de Herschel-Bulkley	81
Tabela 11 - Modelos cinéticos de liberação da triptolida.....	88
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de permeação <i>in vitro</i> da triptolida.	91
Tabela 13 - Determinação do IC₅₀ para HaCaT após 24 h de tratamento.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma	EC	Estrato córneo
µL	Microlitro	EE	Eficiência de encapsulação
µm	Micrômetro	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
µM	Micromolar	ELAM	<i>Endothelial-leukocyte adhesion molecule</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>	EP+D	Epiderme mais derme viável
ANOVA	<i>Análise de variância</i>	EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
BSA	<i>Body Surface Area</i>	h	Hora
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>	HEC	Hidroxietilcelulose
CD	Célula dendrítica	HEC	Hidroxietilcelulose
Células Th	Células T helper	Hz	Hertz
CL	Cristal líquido	IC	Índice de Combinação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	IC₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
CLL	Cristal líquido liotrópico	ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>	ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
CLT	Cristal líquido termotrópico	IFN	Interferon
CP	Coeficiente de Pearson	IL	Interleucina
CPP	<i>Critical Packing Parameter</i>	iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
CV	Coeficiente de variação	JAK	<i>Janus kinase</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>	JNK/MAPK	<i>c-Jun N-terminal kinase/ mitogen-activated protein kinase</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	LD	Limite de detecção
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	LPS	Lipopolissacarídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido	LQ	Limite de quantificação
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	M	Molar
DOTAP	1,2-dioloil-3-propionato de trimetilamônio	M₁ e M₂	Coeficientes de Mander
DP	Desvio padrão	min	Minutos
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>	miRNA	<i>Micro RNA</i>

mL	Mililitros	RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
mM	Milimolar	RNAi	Interferência de RNA
mm	Milímetro	RNAm	RNA mensageiro
mV	Milivolts	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
n	Número	s	Segundos
NF-kB	<i>Nuclear fator Kappa B</i>	SAXS	<i>Small-Angle X-ray Scattering</i>
NLC	Nanodispersão líquido-cristalina	SBF	Soro bovino fetal
NLC TP	Nanodispersão líquido-cristalina carregada com triptolida	shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
nM	Nanomolar	siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
nm	Nanômetros	SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking Analysis</i>	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription proteins</i>
PAH	Poli (alilamina hidrociorada)	TAT	<i>HIV-1 TAT protein 47-57</i>
PASI	<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>	TGF	<i>Transforming growth factor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	TLR	<i>Toll like receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	TLSS	<i>Target Lesion Severity Score</i>
PDI	<i>Polydispersity Index</i>	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
PEI	Polietilenimina	TRBP	<i>Transactivator RNA Binding Protein</i>
PGA	<i>Physician's Global Assessment</i>	TWHF	<i>Tripterygium wilfordii Hook. F.</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico	UV-Vis	Ultravioleta visível
R²	Coeficiente de correlação	VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Rec	Recuperação	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
RISC	<i>RNA Induced silencing complex</i>	vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	III
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1. PSORÍASE	1
1.1.1. FISIOPATOLOGIA DA PSORÍASE	1
1.1.2. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS E NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS	5
1.2. TERAPIA GÊNICA	8
1.2.1. MECANISMO DE INTERFERÊNCIA MEDIADA POR RNA (RNAi)	8
1.2.2. DESAFIOS, ESTRATÉGIAS E APLICAÇÕES DE siRNAs EM DOENÇAS CUTÂNEAS	11
1.3. TRIPTOLIDA	14
1.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	19
1.4.1. CRISTAIS LÍQUIDOS	19
1.4.1.1. Nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs)	24
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>26</u>
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>28</u>
3.1. MATERIAL	28
3.1.1. SOLVENTES, REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS	28
3.1.2. PELES SUÍNAS	29
3.1.3. LINHAGENS CELULARES--	29
3.2. MÉTODOS	30
3.2.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRIPTOLIDA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	30
3.2.1.1. Padronização da metodologia e condições analíticas	30
3.2.1.2. Parâmetros de validação	30
3.2.1.2.1. Seletividade	31

3.2.1.2.2. <i>Linearidade</i>	31
3.2.1.2.3. <i>Precisão e exatidão</i>	32
3.2.1.2.4. <i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	32
3.2.1.2.5. <i>Teste de recuperação em matriz</i>	33
3.2.1.2.6. <i>Robustez</i>	33
3.2.2. DESENVOLVIMENTO DAS NLCs	34
3.2.2.1. Obtenção	34
3.2.2.2. Avaliação da incorporação do polímero catiônico nas NLCs em diferentes concentrações	34
3.2.2.3. Produção de hidrogel contendo as NLCs	34
3.2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NLCs	35
3.2.3.1. Análise do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	35
3.2.3.2. Análise da eficiência de encapsulação da triptolida	35
3.2.3.3. Análise da eficiência de complexação e integridade do siRNA liberado das NLCs	36
3.2.4.3.1. <i>Preparo do gel de agarose 2% e condições eletroforéticas</i>	36
3.2.3.3.2. <i>Preparo das amostras para o ensaio de complexação do siRNA</i>	36
3.2.3.3.3. <i>Preparo das amostras para o ensaio de liberação/ integridade do siRNA</i>	37
3.2.3.4. Análise do rastreamento de partículas	37
3.2.3.5. Análise por espalhamento de raios-X a baixo ângulo	37
3.2.3.6. Estudos de estabilidade física e química das NLCs	38
3.2.3.7. Estudo do comportamento reológico dos hidrogeis contendo as NLCs	39
3.2.3.8. Análise do perfil de textura dos hidrogeis contendo as NLCs	39
3.2.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NLCs	42
3.2.4.1. Análise por microscopia de luz polarizada	42
3.2.4.2. Análise por microscopia de força atômica	42
3.2.5. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> EM CÉLULA VERTICAL DE FRANZ	42
3.2.5.1. Liberação cutânea em membrana sintética	42
3.2.5.2. Permeação cutânea em membrana biológica	43
3.2.5.3. Retenção cutânea em membrana biológica	44
3.2.5.3.1. <i>Análise quantitativa pela técnica de tape-stripping</i>	44

3.2.5.3.2. <i>Análise qualitativa por microscopia confocal de varredura a laser</i>	46
3.2.6. ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	47
3.2.6.1. Cultivo celular	47
3.2.6.1.1. <i>Queratinócitos humanos normais imortalizados</i>	47
3.2.6.1.2. <i>Monócitos humanos primários</i>	47
3.2.6.2. Avaliação da viabilidade celular por resazurina	49
3.2.6.3. Avaliação da eficiência de internalização celular das NLCs	49
3.2.6.3.1. <i>Eficiência de internalização celular por citometria de fluxo</i>	49
3.2.6.3.2. <i>Eficiência de internalização celular por microscopia confocal de varredura a laser</i>	50
3.2.6.4. Estudo dos papéis das vias endocíticas na internalização celular das nanodispersões líquido-cristalinas	51
3.2.6.4.1. <i>Viabilidade celular dos inibidores químicos por resazurina</i>	51
3.2.6.4.2. <i>Avaliação das vias endocíticas por citometria de fluxo</i>	51
3.2.6.5. Avaliação do tráfico intracelular por microscopia confocal de varredura a laser	52
3.2.6.5.1. <i>Análise quantitativa da co-localização</i>	53
3.2.6.6. Avaliação da eficácia terapêutica <i>in vitro</i>	54
3.2.6.6.1. <i>Desenho experimental e amostragem</i>	54
3.2.6.6.2. <i>Quantificação de citocinas por ELISA</i>	55
3.2.6.6.4. <i>Índice de combinação</i>	55
3.2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRIPTOLIDA POR CLAE	56
4.1.1. SELETIVIDADE	56
4.1.2. LINEARIDADE	59
4.1.3. PRECISÃO E EXATIDÃO	61
4.1.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO	62
4.1.5. TESTE DE RECUPERAÇÃO EM MATRIZ	62
4.1.6. ROBUSTEZ	62
4.2. NANODISPERSÃO LÍQUIDO-CRISTALINA COMO SISTEMA CARREADOR MULTIFUNCIONAL	64

4.2.1. DESENVOLVIMENTO DAS NLCs	64
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NLCs	67
4.2.2.1. Parâmetros de caracterização físico-química	67
4.2.2.2. Análise da eficiência de complexação NLC-siRNA e integridade do siRNA liberado	70
4.2.2.4. Estudos de estabilidade física e química das NLCs	76
4.2.2.6. Caracterização dos hidrogéis contendo as NLCs	78
<i>4.2.2.6.1. Comportamento reológico</i>	<i>78</i>
<i>4.2.2.6.2. Perfil de textura e bioadesividade</i>	<i>82</i>
4.2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NLCs	85
4.2.4. ESTUDOS EM CÉLULA VERTICAL DE DIFUSÃO DE FRANZ	87
4.2.4.1. Liberação cutânea em membrana sintética	87
4.2.4.2. Permeação e retenção cutânea em membrana biológica	90
4.2.5. ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	97
4.2.5.1. Viabilidade celular na linhagem HaCaT	97
4.2.5.2. Avaliação da internalização celular, vias endocíticas e tráfico intracelular das NLCs	100
4.2.5.3. Eficácia terapêutica <i>in vitro</i>	111
<u>5. CONCLUSÃO</u>	<u>119</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>122</u>
<u>ANEXO(S)</u>	<u>140</u>
ANEXO 1 – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	140
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	141

1. INTRODUÇÃO

1.1. PSORÍASE

1.1.1. Fisiopatologia da psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória cutânea crônica, que pode acometer a pele, unhas, mucosas e articulações (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; CONRAD; GILLIET, 2018). A sua ocorrência está associada a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais incluem a susceptibilidade genética e desregulações na rede epigenética, estresse físico e psicológico, alterações metabólicas, tabagismo, infecções (estreptocócicas) e alguns medicamentos (por exemplo, lítio, betabloqueadores e anti-inflamatórios não-esteroidais) (WOO; CHO; PARK, 2017; RENDON; SCHÄKEL, 2019; DELIĆ *et al.*, 2020).

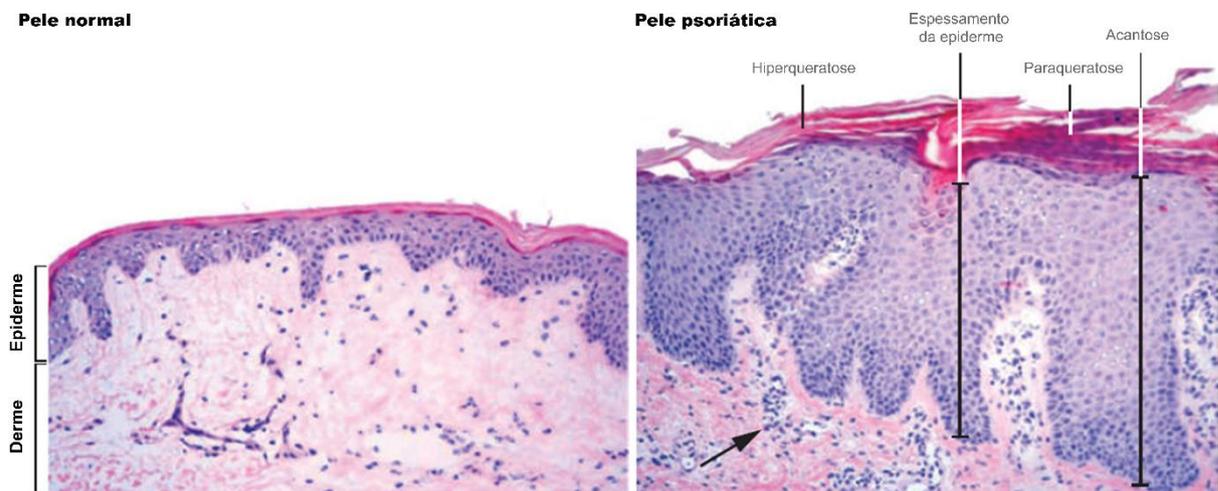
Dados epidemiológicos indicam uma prevalência entre 0,5 a 11,4 %, que pode variar de acordo com a região geográfica e idade (MICHALEK; LORING; JOHN, 2017). Embora raramente seja fatal, a psoríase está relacionada a um alto grau de morbidade, com significativo impacto nas condições econômicas e psicossociais dos pacientes (RODRIGUEZ-VALLECILLO; WOODBURY-FARIÑA, 2014), além de importantes manifestações sistêmicas estarem associadas, como artrite psoriática, disfunções cardiovasculares e hepáticas, síndrome metabólica e doença de Crohn (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Clinicamente a psoríase é caracterizada por placas eritematosas e escamosas, isoladas ou extensas, que pode envolver diversas áreas do corpo. Cinco tipos de psoríase são relatados na literatura: (1) psoríase em placas, também conhecida como psoríase vulgar; (2) psoríase gutata (gotícula) ou eruptiva caracterizada por manchas escamosas em forma de “lágrima”; (3) psoríase inversa, também chamada de psoríase intertriginosa ou flexural, encontrada geralmente nas dobras da pele; (4) psoríase pustular, que pode assumir a forma de pustulosa palmoplantar ou psoríase pustular generalizada; e (5) psoríase eritrodérmica, uma complicação rara e muito grave da psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; CONRAD; GILLIET, 2018).

Histologicamente, a psoríase tem uma aparência definidora, semelhante entre os subtipos, mas que se distingue de outras doenças inflamatórias (**Figura 1**). É observado um acentuado espessamento da epiderme, devido à hiperplasia dos

queratinócitos na epiderme interfolicular (acantose), acompanhado de projeções descendentes alongadas e finas na derme. As escamas superficiais são devido à diferenciação terminal incompleta dos queratinócitos, principalmente na camada granular epidérmica, característico de hiperqueratose acompanhada de paraqueratose. A intensa infiltração de neutrófilos (microabcessos de *Munro*), leucócitos mononucleares e neoangiogênese com vasos sanguíneos alongados/ hiperplásicos na região dérmica papilar (entre a retina epidérmica) são características comuns nas lesões psoriáticas (WAGNER *et al.*, 2010; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; MAHIL; CAPON; BARKER, 2016).

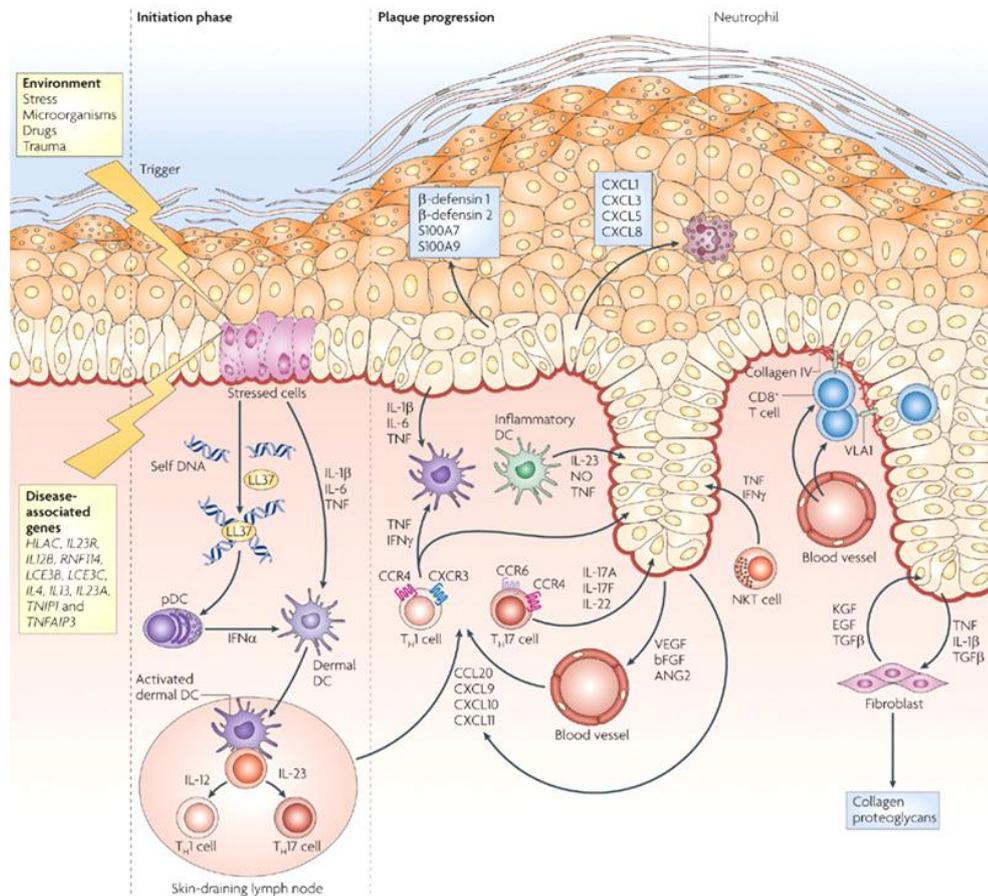
Figura 1 - Aspectos histológicos da pele normal e psoriática.



Fonte: adaptado de WAGNER *et al.* (2010).

Nas últimas décadas o modelo patogênico da psoríase foi profundamente revisado de acordo com uma compreensão mais ampla e aprofundada dos mecanismos imunológicos associados à formação das placas psoriáticas (NESTLE *et al.*, 2009; OGAWA *et al.*, 2018; YADAV; SINGH; SINGH, 2018), sendo, principalmente, associados às interações desreguladas dos componentes do sistema imunológico inato e adaptativo com as células cutâneas residentes (**Figura 2**). Em particular, o delicado equilíbrio nas interações dos queratinócitos e células do sistema imunológico é perturbado nas lesões cutâneas psoriáticas (MAHIL; CAPON; BARKER, 2016; CHIRICOZZI *et al.*, 2018; KABASHIMA *et al.*, 2019; DELIĆ *et al.*, 2020).

Figura 2 - Imunopatogênese da psoríase.



Fonte: NESTLE *et al.* (2009).

Os primeiros passos da cascata patogênica consistem na ativação de células dendríticas (CDs) plasmacitoides por agonistas de receptores *Toll-like* (TLRs) (por exemplo, chemerina, β -defensinas, peptídeos antimicrobianos e lisozima) e/ou ativação de células T autorreativas. Dentre os agonistas TLRs a formação de complexos de auto-DNA extracelular com o peptídeo LL37 ativa receptores TLR-9 em CDs plasmocitoides, estimulando a liberação de interferon (IFN) do tipo I (altos níveis de IFN- α), que, juntamente com fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-1 β , ativa as CDs mielóides locais, ou ainda, ativa diretamente as CDs mielóides via TLR-7 e -8, o que leva a regulação positiva de TNF- α e IL-6 (MAHIL; CAPON; BARKER, 2016; CHIRICOZZI *et al.*, 2018; SCHÖN, 2019).

As CDs mielóides, produtoras de TNF- α , IL-6, IL-23, IL-20, óxido nítrico e moléculas estimulatórias de células T, migram para os linfonodos drenantes que ativam as células T alogênicas (CHIRICOZZI *et al.*, 2018; PASTOR-FERNÁNDEZ; MARIBLANCA; NAVARRO, 2020). As células T ativadas entram na circulação e se

movem em direção à pele inflamada por meio de interações com moléculas de adesão via expressão de integrinas- $\alpha\epsilon\beta_7$ (incluindo P- e E-selectinas) nas células endoteliais. Além disso, a justaposição de células T e CDs maduras em agregados dérmicos, bem como a expressão de quimiocinas atrativas de linfócitos (CCL-18, CCL-19, CCL-21 e CXCL-12) pode promover a ativação de células T *in situ* (FOTIADOU *et al.*, 2018; OGAWA *et al.*, 2018).

As células T após serem ativadas, diferenciam-se em células T helper (Th) tipo 1 (produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2) e Th17 (produtoras de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-22) e expressam receptores de quimiocinas (CXCR-3, -4 e -6) e fatores de transcrição (do inglês, *signal transducer and activator of transcription* [STAT]-1 e -3), que contribuem para a migração e sinalização aos sítios de lesão (SCHÖN, 2019; LI *et al.*, 2020a). O IFN- γ , neste estágio inicial, estimula a produção de quimiocinas (por exemplo, CXCL-10, CXCL-11) e a liberação de moléculas de adesão dos queratinócitos, facilitando o recrutamento de linfócitos para os locais inflamatórios, por meio da regulação positiva do supressor da sinalização de citocinas (do inglês, *suppressor of cytokine signaling* [SOCS]-1) (MAHIL; CAPON; BARKER, 2016; SCHÖN, 2019).

Células T $\gamma\delta$, Th22 e Th9, produtoras de quimiocinas e citocinas específicas, são encontradas na pele psoriática em um número substancial e contribuem para o aumento das respostas mediadas pelo eixo IL-23/ IL-17, o qual sustenta o processo inflamatório por meio da ativação de moléculas pró-inflamatórias e pró-proliferativas derivadas das células T, hiperplasia tecidual e neoangiogênese (SCHÖN; ERPENBECK, 2018; JEE *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020a; PASTOR-FERNÁNDEZ; MARIBLANCA; NAVARRO, 2020).

Outras células imunológicas, como neutrófilos e mastócitos infiltram-se na derme e migram para a epiderme sob estímulo quimiotático. Os neutrófilos na epiderme formam os microabscessos de *Munro*, que representam uma das características histopatológicas da doença. A produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, -17 e -22), tanto por neutrófilos quanto pelos mastócitos, induz a sobrevivência, recrutamento e ativação dessas células (CHIRICOZZI *et al.*, 2018; OGAWA *et al.*, 2018).

A resposta tecidual mais relevante é fornecida pelos queratinócitos, responsáveis pela ampliação da inflamação por meio da produção de citocinas (IL-1F9, TNF- α , IL-17, IL-19 e linfopoiétina do estroma tímico), quimiocinas (CCL20,

CXCL1-3, CXCL8-11), fatores estimulantes da proliferação (EGF e VEGF) e outros mediadores pró-inflamatórios. Esse sinergismo promove também o recrutamento de células Th17, Th22 e CD8 (WOO; CHO; PARK, 2017; SCHÖN; ERPENBECK, 2018). Em resposta aos mediadores pró-inflamatórios produzidos por essas células, os queratinócitos são estimulados a intensa expansão e manutenção das placas psoriáticas, por meio da ativação de vias de sinalização (STAT-1 e -3 e NF-κB) e regulação positiva de uma série de genes pró-inflamatórios (CHIRICOZZI *et al.*, 2018; SCHÖN, 2019; YADAV; SINGH; SINGH, 2018).

Embora os queratinócitos sejam considerados as principais células a responderem ao microambiente das citocinas, é notável a contribuição de outras células teciduais no processo. Os melanócitos são responsáveis pela expressão de autoantígenos, como ADAMTSL5, enquanto que os fibroblastos secretam a chemerina e outros componentes pró-inflamatórios, como IL-6 e metaloproteinases. As células endoteliais favorecem a migração de células inflamatórias para os locais lesionados por meio da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, entre outras) (CHIRICOZZI *et al.*, 2018; KABASHIMA *et al.*, 2019).

Em conjunto, esses mecanismos sustentam a teoria de que, na psoríase, existe um circuito de *feedback* positivo entre as células do sistema imunológico e as células epiteliais e endoteliais residentes. Os estudos nesta vertente proporcionaram uma melhor compreensão da patogênese e relevância de certos tipos celulares, vias de sinalização na psoríase em comparação com outros distúrbios inflamatórios da pele. Além disso, os novos conhecimentos sobre a imunopatogênese da psoríase levaram a investigações e desenvolvimento de novas terapias mais efetivas, caracterizadas por mecanismos de ação altamente seletivos, visando citocinas e receptores imunológicos (CHIRICOZZI *et al.*, 2018; CONRAD; GILLIET, 2018; PASTOR-FERNÁNDEZ; MARIBLANCA; NAVARRO, 2020).

1.1.2. Tratamentos convencionais e novos agentes terapêuticos

A abordagem terapêutica anti-psoriática é motivada principalmente pela gravidade da doença, e, desta forma, é comumente avaliada pelo uso de ferramentas que determinam o grau e a evolução do tratamento. O método PASI (do inglês, *Psoriasis Area and Severity Index*) em conjunto com os dados de BSA (do inglês, *Body Surface Area*) ou PGA (do inglês, *Physician's Global Assessment*) é o mais empregado clinicamente, embora um novo método tenha sido introduzido, o TLSS (do

inglês, *Target Lesion Severity Score*) (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; CHIRICOZZI *et al.*, 2017).

O tratamento atual para a psoríase não é curativo; no entanto, há uma gama de opções terapêuticas para o manejo da doença. A doença em um estágio leve pode ser efetivamente tratada com preparações tópicas, enquanto que em condições moderada a grave, os tratamentos podem incluir fototerapia e terapias sistêmicas. A terapia tópica desempenha um papel em todo o espectro de gravidade da doença na psoríase, e na doença moderada e grave, o tratamento tópico pode diminuir a necessidade de tratamento sistêmico e fototerapia (CHIRICOZZI *et al.*, 2017; CONRAD; GILLIET, 2018).

Os corticosteróides e os análogos da vitamina D (calcipotriol e tacalcitol) demonstram efeitos satisfatórios no controle da doença, devido a ação anti-inflamatória e regulação sobre a proliferação e diferenciação dos queratinócitos (DENG *et al.*, 2016). A combinação de ambos também se mostrou efetiva no tratamento de áreas do couro cabeludo afetadas pela psoríase. No entanto, o uso contínuo dos corticosteroides está associado a riscos, como atrofia cutânea, hipopigmentação, taquifilaxia, resistência à terapia e, em casos esporádicos, supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Os análogos da vitamina D também não são isentos de efeitos secundários, entre os quais incluem a irritação da pele e hipercalcemia (CASTELA *et al.*, 2012; CHIRICOZZI *et al.*, 2017).

Os inibidores de calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus) podem representar uma opção terapêutica no tratamento da psoríase, devido a sua capacidade de suprimir a ativação e proliferação das células T. Diversos estudos relatam a eficácia aumentada do uso de tacrolimus associado a outras terapias e efeitos adversos mínimos em comparação aos corticosteroides e análogos da vitamina D. No entanto, atualmente, apesar de sua utilização *off-label* ser comum na clínica, o seu uso se restringe a pequenas áreas de pele sensível e de difícil tratamento, tais como a face e genitais (MALECIC; YOUNG, 2016; CHIRICOZZI *et al.*, 2017).

Outros tratamentos tópicos disponíveis incluem os retinoides, coaltar e antralina (ditranol). Os retinoides, derivados da vitamina A, constituem uma opção única dentro do arsenal de tratamentos anti psoriáticos, por atuarem na supressão direta da inflamação, bem como a inibição da proliferação e a normalização da diferenciação da camada epidérmica. De forma semelhante aos análogos da vitamina D, a sua eficácia e tolerabilidade são aumentadas quando associados aos corticosteroides

tópicos. Esta associação também inibe o efeito atrofogênico e impede os efeitos de rebote pós-utilização (KHALIL *et al.*, 2017). O coaltar é frequentemente usado como parte do regime de Goeckerman. Constitui uma opção segura e altamente eficaz, e os pacientes permanecem em remissão por mais tempo do que com outros tratamentos tópicos de psoríase (SEKHON *et al.*, 2017). A antralina, por atuar na redução da proliferação de queratinócitos, prevenir a ativação de células T e restaurar a diferenciação celular, demonstrou ao longo dos anos, ser um dos tratamentos tópicos mais eficazes para psoríase (HOLSTEIN *et al.*, 2017).

A terapia sistêmica é indicada para a psoríase moderada a grave e inclui o uso de metotrexato, ciclosporina A, acitretina e, em alguns países, ésteres de ácido fumárico. Esses agentes são indicados, principalmente, pelos efeitos imunossupressores. No entanto, a aplicação a longo prazo é limitada, principalmente pela tolerância e toxicidade cumulativa. Com o monitoramento adequado, todos, exceto a ciclosporina A, que geralmente é aplicada em curto prazo, podem ser usados para a terapia de manutenção da psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Além disso, nos últimos anos foi aprovado o apremilast, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 4, como alternativa no tratamento sistêmico da doença. A inibição desta enzima resulta em um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclica, que por sua vez, modula negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-23, IL-17 e outras envolvidas no processo patogênico da psoríase (TORRES; PUIG, 2018).

A fototerapia (ultravioleta B de banda estreita) e a fotoquimioterapia (psoraleno mais ultravioleta A) associada a terapia sistêmica é necessária para pacientes com doença em grau moderado a grave. Os efeitos na terapia anti-psoriática são amplos e eficazes, que incluem a redução das células Langerhans, inibição da ativação de células T, indução da apoptose em células T ativadas, efeito anti-angiogênico e antiproliferativos sobre os queratinócitos e células endoteliais. No entanto, o potencial carcinogênico limita o uso a longo prazo (MORITA, 2018; ZHANG; WU, 2018).

Nas últimas décadas, a terapia com biofármacos também tem sido uma das estratégias terapêuticas utilizadas para inibir ou modular especificamente a atividade de células T ou mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da psoríase (WOO; CHO; PARK, 2017; PASTOR-FERNÁNDEZ; MARIBLANCA; NAVARRO, 2020). Um número crescente de biofármacos foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) nos últimos anos (SHALHOUT *et al.*, 2020). Em sua grande maioria, a citocina TNF é o alvo molecular

predominante dos novos agentes, como infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab. Outros anticorpos monoclonais são direcionados a IL-17A (ixekizumab e secukinumab), IL-17R (brodalumab), CD11a (efalizumab), IL-12/IL-23 p40 (ustekinumab) e IL-23 p19 (guselkumab e tildrakizumab). Ainda em fase clínica e em relatos de casos da literatura, uma série de biofármacos visando outros alvos moleculares, como citocinas e seus receptores (IL-1 α , IL-1R, IL-2, IL2R, IL-6R, IL-8, IL-20, IL-22, IL-12/ IL-23 p40), antígeno associado à função linfocitária 3, receptor adenosina A3, I κ B kinase, molécula *Janus kinase* (JAK)-1/3 e -1/2, proteína C reativa, e proteína quinase ativada por mitógeno-p38, estão sendo investigados na terapia antipsoriática (TSAI; TSAI, 2017; CIECHANOWICZ *et al.*, 2018; SHALHOUT *et al.*, 2020).

Em relação à eficácia terapêutica, os biofármacos têm demonstrado melhores resultados a curto prazo em relação a terapia medicamentosa sistêmica convencional, embora isso tenha sido provado até o momento em apenas alguns estudos clínicos comparativos. Apesar de serem bem tolerados e dos resultados terapêuticos promissores, há relatos de muitos efeitos adversos potencialmente graves, principalmente para a terapia anti-TNF (CONNOR, 2011; CARRASQUILLO *et al.*, 2020). Alguns dos efeitos colaterais comuns incluem: reações no local de aplicação, maior incidência de infecções, formação de auto-anticorpos e lúpus eritematoso induzido por drogas, anormalidades das funções hepáticas, distúrbios hematológicos e neoplasias de órgãos sólidos (CONNOR, 2011; MURDACA *et al.*, 2019; CARRASQUILLO *et al.*, 2020).

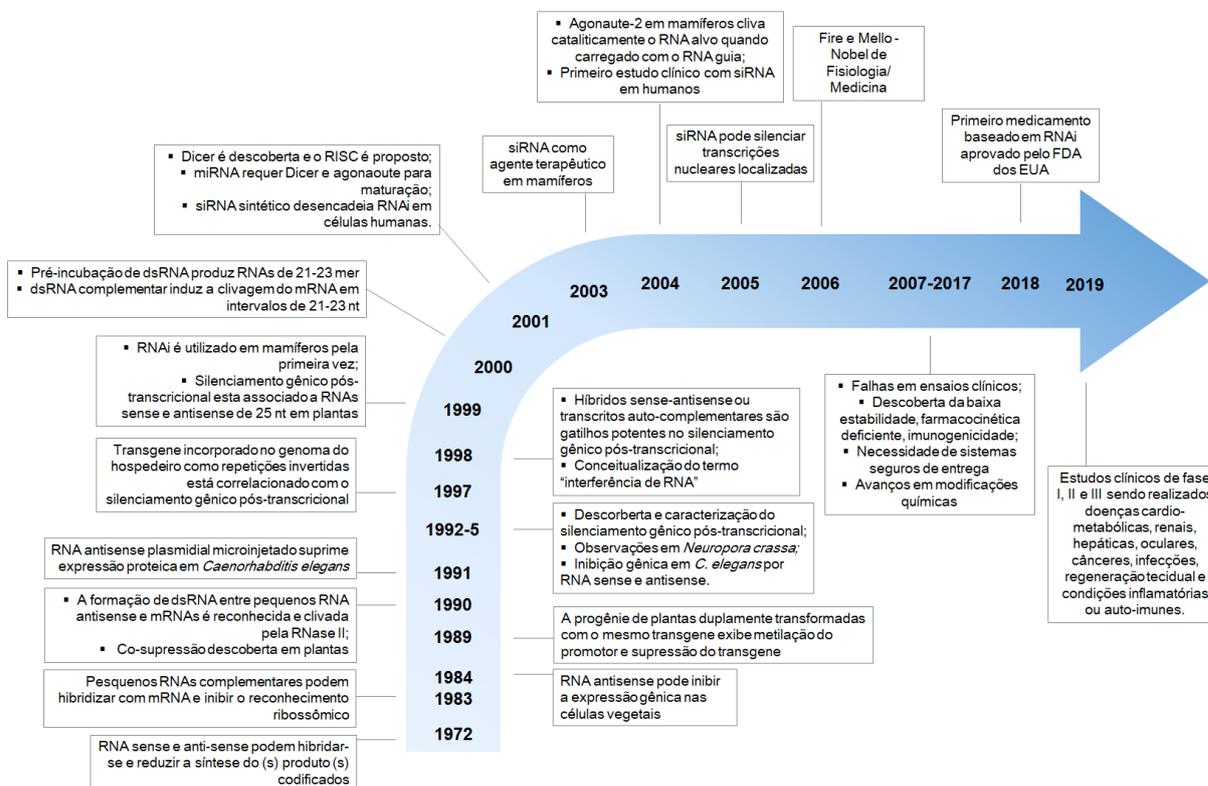
1.2. TERAPIA GÊNICA

1.2.1. Mecanismo de interferência mediada por RNA (RNAi)

A interferência mediada por RNA (RNAi) é um fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional de genes alvo homólogos. Desde a sua descoberta em plantas e microorganismos na década de 80 e posteriormente, demonstrações de processos semelhantes em células de mamíferos em 2001, a RNAi ganhou notável atenção e tornou-se um procedimento comum para estudar funções de genes e identificar potenciais genes-alvos relacionados a doenças (FIRE *et al.*, 1998;

ELBASHIR *et al.*, 2001; CAILLAUD; EL MADANI; MASSAAD-MASSADE, 2020) (Figura 3).

Figura 3 - Histórico de desenvolvimento da terapêutica com RNAi.



Fonte: Adaptado de Setten; Rossi; Han (2019) e Weng *et al.* (2019).

Além de ser uma ferramenta na pesquisa genômica funcional, a RNAi é uma grande promessa na terapia gênica, principalmente em doenças em que o silenciamento de genes-específicos seja benéfico para a redução ou supressão de produtos codificados (KACZMAREK; KOWALSKI; ANDERSON, 2017; WENG *et al.*, 2019). Nos últimos anos, uma série de dificuldades foram enfrentadas por empresas e pesquisadores acadêmicos para superar as falhas de ensaios clínicos com RNAi. Os avanços substanciais na área molecular combinados com uma seleção mais criteriosa da doença e alvos terapêuticos, processos de desenvolvimento clínicos validados e melhores capacidades de fabricação, permitiram a criação de uma nova linha de compostos terapêuticos mais seguros e eficazes (SETTEN; ROSSI; HAN, 2019; CAILLAUD; EL MADANI; MASSAAD-MASSADE, 2020).

Em 2018, o FDA dos EUA aprovou um medicamento baseado em RNAi (Onpattro; Alnylam Pharmaceuticals) para o tratamento da amiloidose transtiretina hereditária com polineuropatia. Outros candidatos a medicamentos para doenças

cardio-metabólicas, hepáticas, renais e oculares estão atualmente em ensaios clínicos de fase I, II e III, e são esperadas aplicações investigativas de novos medicamentos visando o sistema nervoso central e outros tecidos. Essa aprovação anuncia uma nova era no campo da terapia com RNAi, permitindo que novas investigações, aprimoramentos e tratamentos inovadores sejam aplicados em clínica (SETTEN; ROSSI; HAN, 2019; WENG *et al.*, 2019).

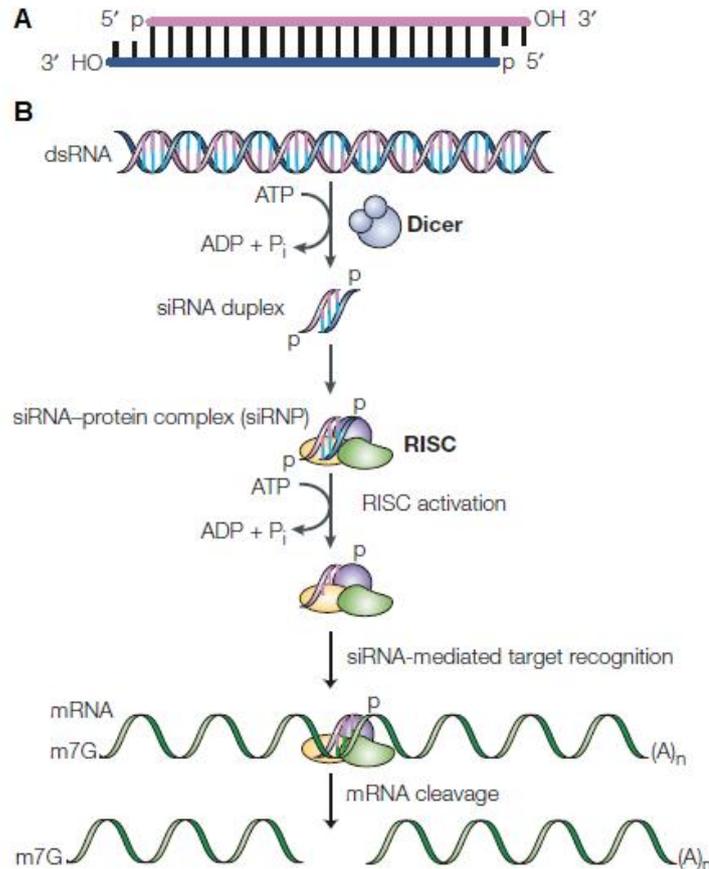
O mecanismo de RNAi pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de iniciação, onde ocorre a geração de moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas em relação a sua origem e função (do inglês, *small interfering RNA*, [siRNA]; *micro RNA*, [miRNA]; e *short hairpin RNA*, [shRNA]), e a fase de execução, onde ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos proteicos e a promoção do silenciamento gênico (DYKXHOORN; NOVINA; SHARP, 2003; WITTRUP; LIEBERMAN, 2015).

No citoplasma das células, o RNA de fita dupla (dsRNA) é identificado por uma enzima ribonuclease, chamada Dicer, que o cliva em pequenos fragmentos de cadeia dupla de 21 a 23 pares de bases. Esses fragmentos são reconhecidos como siRNA. Posteriormente, siRNA se monta em um complexo multiproteico (do inglês, *RNA-induced silencing complex* [RISC]) via proteína TRBP (do inglês, *Transactivator RNA Binding Protein*). O RISC funcional inclui quatro subunidades diferentes: helicase, exonuclease, endonuclease e domínios de homologação. À medida que o siRNA se liga ao RISC, o siRNA duplex é clivado pela helicase, levando à formação de duas cadeias simples. Isso resulta na admissão da cadeia *anti-sense* para se ligar às moléculas alvo do RNA mensageiro (RNAm). A endonuclease (argonaute-2) hidrolisa o RNAm homólogo no local onde a cadeia *anti-sense* está ligada (**Figura 4**). O RNAi possui um mecanismo de ação *anti-sense*, pois, em última instância, um RNAm de cadeia única se liga ao RNAm alvo pelas regras de emparelhamento da base Watson-Crick e recruta uma ribonuclease que degrada o RNA alvo (DYKXHOORN; NOVINA; SHARP, 2003; MEISTER; TUSCHL, 2004; AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007; SASHITAL; DOUDNA, 2010).

Um fator de grande importância é a complementaridade entre o RNAm alvo e a fita *anti-sense* do siRNA, pois a clivagem só ocorrerá se esta for homóloga. Para tanto, o complexo RISC possui um domínio de verificação onde se inicia a ligação entre o alvo e o siRNA, numa região denominada semente. Após a extensão da complementaridade desta região para o restante do RNAm, a enzima argonaute-2 é

ativada, clivando o alvo e gerando o silenciamento (MEISTER; TUSCHL, 2004; CERUTTI; CASAS-MOLLANO, 2006; BELLEFROID *et al.*, 2019).

Figura 4 - Mecanismo de silenciamento mediado por siRNA. [A] Estrutura siRNA. **[B]** Processo de silenciamento gênico.



Fonte: DYKXHOORN *et al.* (2003).

1.2.2. Desafios, estratégias e aplicações de siRNAs em doenças cutâneas

Diante do seu potencial terapêutico, o silenciamento gênico via siRNA criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação a terapia tradicional. As vantagens dessa estratégia incluem, principalmente, a ação diretamente no citoplasma, sem necessidade de atingir o núcleo; elevada especificidade, devido à projeção de sequências moleculares de acordo com o gene-alvo; e alta eficiência devido à natureza catalítica do processo, no qual as moléculas de siRNA podem ser usadas repetidas vezes para guiar a clivagem de moléculas de RNAm alvo (VICENTINI *et al.*, 2013b; SETTEN; ROSSI; HAN, 2019).

Nos últimos anos, diversos estudos clínicos a base de siRNA foram conduzidos para uma variedade de doenças de ordem cutânea e sistêmica, e os resultados

mostraram-se promissores, reforçando a grande viabilidade dessa nova modalidade terapêutica (ALJUFFALI; LIN; FANG, 2016; ROSA *et al.*, 2018; WENG *et al.*, 2019; AIN *et al.*, 2020). No entanto, devido as suas características intrínsecas, como instabilidade e susceptibilidade a degradação, tamanho (~13 kDa), natureza aniônica, penetração ineficiente nas células e um perfil farmacocinético deficiente, impossibilitaram o seu uso direto no tratamento de doenças (LIU *et al.*, 2018a). Devido a essas limitações e aos fatores relacionados à administração pela via tópica, o desenvolvimento de sistemas carreadores é apontado como fator chave para viabilizar a aplicação clínica da terapia anti-sense em doenças dermatológicas (VICENTINI *et al.*, 2013b; TAI; GAO, 2017; LIU *et al.*, 2018a).

Um carreador ideal para a entrega de siRNA deve satisfazer alguns requisitos, como: i) ultrapassar as barreiras inerentes a cada via de administração; ii) ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra degradação enzimática; iii) facilitar a transfecção celular e superar a incapacidade das moléculas de siRNA difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática; iv) promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização lisossomal; e v) não provocar uma resposta imune ou tóxica no organismo (DURYMANOV; REINEKE, 2018).

Os principais carreadores utilizados para a entrega efetiva dos siRNAs incluem os de origem virais e não virais (VIDEIRA *et al.*, 2014; DURYMANOV; REINEKE, 2018; LIU *et al.*, 2018a). Os sistemas virais são os mais eficazes e atualmente correspondem por mais de 70% dos vetores usados em ensaios clínicos. No entanto, limitações de tamanho da carga e incertezas sobre mutagênese, toxicidade, imunogenicidade e altos custos de fabricação limitam o seu desempenho e avanço clínico, o que direciona a pesquisa para soluções alternativas (YANG; LIU; ZHANG, 2014). Diante disso, os vetores não-virais surgiram como importantes sistemas carreadores bio-compatíveis, de fácil produção, passíveis de modificações estruturais e direcionamento a diferentes alvos celulares, além de baixa resposta imunogênica (TATIPARTI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018a; KIM; PARK; SAILOR, 2019).

Alguns dos vetores de genes não virais mais comumente usados são lipoplexos e poliplexos, e em alguns casos, os sistemas nanoparticulados (como nanopartículas inorgânicas e nanopartículas orgânicas), que tem ganhado grandes avanços tecnológicos e incentivo científico. O uso de nanopartículas tem apresentado resultados promissores na entrega citosólica e silenciamento gênico de diferentes

alvos (SHEN *et al.*, 2018; ULUDAG; UBEDA; ANSARI, 2019), principalmente após o primeiro ensaio clínico ser publicado em 2010 (DAVIS *et al.*, 2010). Nesses sistemas, o material genético é tipicamente complexado e neutralizado com agentes catiônicos, como polímeros ou lipídeos de alto peso molecular por meio de interações iônicas não covalentes. Tais complexos condensados não covalentes podem mediar alta eficiência de transfecção e proteger contra degradação e reconhecimento imune (KARGAARD; SLUIJTER; KLUMPERMAN, 2019; ITA, 2020). Os polímeros catiônicos, como polietilenimina (PEI), quitosana, poli- β -aminoésteres, dentre outros, são em sua grande maioria, os agentes de transfecção mais utilizados para entrega de RNA e oligo-DNAs. No entanto, uma desvantagem fundamental dos sistemas polycations é a citotoxicidade inerente que eles causam devido à sua carga positiva, tornando-os indesejáveis para adaptação em aplicações de terapia gênica (KARGAARD; SLUIJTER; KLUMPERMAN, 2019; SALAMEH *et al.*, 2020).

Neste contexto, a pesquisa atual visa o uso de estratégias alternativas para alcançar altas taxas de internalização e menores efeitos tóxicos, como o uso de peptídeos de penetração celular, síntese e modificações químicas estruturais (DONG; SIEGWART; ANDERSON, 2019; KARGAARD; SLUIJTER; KLUMPERMAN, 2019; CAILLAUD; EL MADANI; MASSAAD-MASSADE, 2020). Como exemplo, relatórios científicos mostraram que a superfície de nanopartículas modificadas com o polímero poli(alilamina hidrocloreto) (PAH) apresentou resultados significativos na entrega de ácidos nucleicos e fármacos, além de melhores respostas celulares quando comparado a outros agentes catiônico, como policloreto de dialil dimetil amônio e PEI, além de controlar a liberação de fármacos de modo pH-dependente (HAN, L.; TANG; YIN, 2015; MA *et al.*, 2016; WANG, B. *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016; ZHANG, C. *et al.*, 2017). Taxas de transfecção celular equivalentes foram obtidas com nanopartículas de ouro recobertas com PAH em relação às nanopartículas com PEI, além de efeitos silenciadores aprimorados e melhor citocompatibilidade (ZHAO *et al.*, 2012).

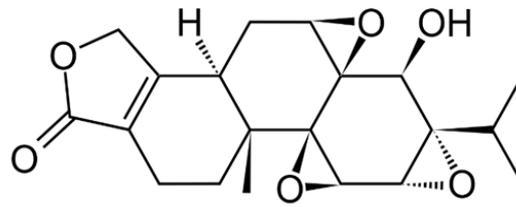
Em relação à entrega tópica de ácidos nucleicos, a forte demanda por tratamentos mais eficazes para os numerosos distúrbios da pele emergiu para a aplicação de siRNAs e outros oligonucleotídeos, como estratégia para modular a expressão dos genes responsáveis pelas desordens cutâneas (VICENTINI *et al.*, 2013b; ALJUFFALI; LIN; FANG, 2016; AIN *et al.*, 2020). Essa terapia tem sido aplicada principalmente no tratamento de feridas (reparo tecidual), doenças inflamatórias (acne e dermatite), parasitária (leishmania cutânea), infecciosas (lepra, micoses e herpes),

auto-imunes (*Alopecia areata*, vitiligo e psoríase), de ordem genética (paquioniquia congênita, *Epidermolysis bullosa* e albinismo oculocutâneo) e no câncer de pele (ROSA *et al.*, 2018).

Na terapia anti-psoriática os alvos de silenciamento têm sido direcionados a citocinas envolvidas na cascata imunopatológica. siRNA β -defensiva-2 e siRNA IL-6 veiculados em lipossomas e nanodispersões líquido-cristalinas, respectivamente, proporcionaram um silenciamento eficiente dos genes-alvos em modelo de pele psoriática *in vitro*, além de permitir uma maior penetração cutânea (DEPIERI *et al.*, 2016; DESMET *et al.*, 2016). Em estudos *in vivo*, a aplicação de nanopartículas híbridas lipídicas-poliméricas co-carregadas com siRNA TNF- α e capsaicina, carreador líquido nanoestruturado co-carregado com tacrolimus e siRNA TNF- α , e nanodispersões líquido-cristalinas funcionalizadas com peptídeo de penetração (TAT) e siRNA TNF- α mostraram reduzir as lesões psoriáticas e uma diminuição acentuada dos níveis de TNF- α (DESAI *et al.*, 2013; PETRILLI *et al.*, 2016; VIEGAS *et al.*, 2020). Pandi *et al.* (2018) mostraram que a aplicação de siRNA TNF- α veiculado em dendrímeros ou lipossomas resultou em uma melhora das características fenotípicas e histopatológicas da psoríase induzida em animais, acompanhadas de acentuada redução dos níveis de IL-6, TNF- α , IL-17 e IL-22 (PANDI *et al.*, 2018). De forma semelhante, a aplicação de erlotinib e siRNA IL-36 em nanopartículas lipídicas e siRNA EGF veiculado em nanopartículas coloidais de ouro também demonstraram melhorar o perfil psoriático *in vivo* (BOAKYE *et al.*, 2017; NEMATI *et al.*, 2017).

1.3. TRIPTOLIDA

A triptolida, um diterpenotriepóxido (**Figura 5**), componente ativo majoritário extraído das raízes da erva chinesa *Tripterygium wilfordii* Hook. F. (TWHF) possui um potencial terapêutico de amplo espectro devido às suas propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias e antitumorais (ZHOU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2018). Desde a sua extração e isolamento em 1972 por Kupchan *et al.*, seus efeitos farmacológicos e toxicidade clínica foram extensivamente investigados (ZHOU *et al.*, 2012; XI *et al.*, 2017; TASNEEM *et al.*, 2019).

Figura 5 - Estrutura química da triptolida.

Fonte: ZHOU *et al.* (2012).

Os efeitos terapêuticos da triptolida isolada e em preparações brutas da TWHF foram avaliados em ensaios clínicos na China e nos EUA para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias de ordem cutânea e sistêmica (LIU, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2018; LI; HAO, 2019). Na terapia anti-psoriática os pacientes com diferentes tipos da doença (vulgar, pustulosa, gutata ou eritrodérmica) exibiram uma melhora das áreas psoriáticas e diminuição do PASI, em relação aos grupos placebo. No entanto, foi relatada a ocorrência de efeitos secundários, como irritações gastrointestinais, alterações no ciclo menstrual e leve leucocitopenia, efeitos estes, reversíveis após interrupção do tratamento (HAN *et al.*, 2012b).

Outras investigações pré-clínicas e clínicas com a triptolida incluem a sua aplicação como estratégia terapêutica em lesões medulares e ósseas, doenças intestinais, renais, oculares, neuronais e pulmonares, e em diversos tipos de cânceres. Além disso, a triptolida mostrou resultados promissores como um agente indutor da tolerância imunológica em transplantes (como os transplantes de ilhotas pancreáticas em pacientes diabéticos; e de rins) (LI; JIANG; ZHANG, 2014; CHEN *et al.*, 2018; LI; HAO, 2019).

Os mecanismos moleculares de ação da triptolida estão envolvidos com a inibição global da transcrição por meio da subunidade RPB1 da RNA polimerase II, sendo crítica para a transcrição de mRNAs. Além disso, numerosas moléculas e vias de sinalização relacionadas à apoptose e respostas imunes/ inflamatórias são afetadas pela triptolida, a maioria das quais, após a inibição transcricional. Várias proteínas foram identificadas como alvo de ligação a triptolida, incluindo a policistina-2, desintegrina e metaloprotease 10 e dCTP pirofosfatase 1 (LIU, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2018; RIMEL; TAATJES, 2018). Fatores de transcrição, como NF- κ B (do inglês, *nuclear factor Kappa B*), fator de transcrição de choque térmico 1 (acompanhado da redução da expressão da proteína Hsp70), proteína ativadora-1,

fator nuclear de células T ativadas e fator induzido por hipóxia-1 α também foram reportados como alvos de ligação da triptolida (CHEN, S. R. *et al.*, 2018; LIU, Q., 2011; RIMEL; TAATJES, 2018; ZHOU, Z. L. *et al.*, 2012; LI, X. J.; JIANG; SONG, C. *et al.*, 2019).

A proteína XPB (do inglês, *xeroderma pigmentosum type B*; ou também chamada de ERCC3), uma helicase associada a mecanismos de reparo e transcrição de DNA, tem sido também reportada como alvo molecular da triptolida. Neste caso, a triptolida se liga covalentemente a XPB, inibindo sua atividade ATPásica dependente do DNA. A XPB, é uma subunidade do fator de transcrição geral, TFIIF, que é essencial para que a RNA polimerase II reconheça os promotores e inicie a transcrição com precisão. Enquanto isso, a XPB está envolvida no reparo de excisão de nucleotídeos em resposta a danos no DNA. Portanto, a inibição da XPB pela triptolida potencializa a inibição da transcrição mediada pela RNA polimerase II e o processo de reparação de danos no DNA (ZHOU *et al.*, 2012; RIMEL; TAATJES, 2018).

Investigações *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a triptolida inibe a função proliferativa das células T e também pode atuar na inibição da IL-2 por meio de vias envolvendo íons cálcio. Na imunidade humoral, a triptolida interfere parcialmente na proliferação de células B e na produção de imunoglobulinas. Por outro lado, as funções dos macrófagos são intensamente inibidas, resultante da supressão gênica de numerosos mediadores pró-inflamatórios (IFN- α ; TNF- α ; IL-1, -4, 6, -8 e -23; ciclooxigenase-2 e prostaglandina E2) e expressão de receptores de células T. A diferenciação e migração das CD4 também é afetada pela regulação negativa da expressão de receptores e proteínas de superfície (MATTA *et al.*, 2009; LIU, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2018).

Em outros tipos celulares, como fibroblastos sinoviais, fibroblastos da córnea, células epiteliais brônquicas e condrócitos, a triptolida demonstrou desencadear efeitos citostáticos e apoptóticos, além de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, -8, e -18; TNF- α e ciclooxigenase-2) (LIU, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2019). Nos estudos de Hongqin Tu *et al.* (2011) a triptolida mostrou reduzir significativamente a expressão do receptor α de IFN- γ , ICAM-1 na superfície celular e de pJAK2 em queratinócitos humanos normais (linhagem HaCaT), além de regular positivamente SOCS-1 (TU *et al.*, 2011).

Apesar de suas múltiplas atividades biológicas e desempenho clínico notável, a aplicação da triptolida na clínica médica é limitada, principalmente, devido a sua

baixa solubilidade em água (coeficiente de partição n-octanol/água de 0,58), baixa biodisponibilidade oral, acentuada toxicidade e baixo índice terapêutico, além dos baixos rendimento de extração (HOU; LIU; XU, 2019). Desta forma, diferentes estratégias tem sido empregadas para viabilizar o seu uso, como a síntese moléculas estruturalmente semelhantes, administração concomitante com outros fármacos e a sua veiculação em sistemas nanoestruturados (CHEN *et al.*, 2018). A conjugação direta da triptolida com ligantes selecionados, como aptâmeros, anticorpos, peptídeos ou resíduos de açúcar também tem sido uma estratégia útil para melhorar os aspectos farmacológicos e físico-químicos da triptolida (HOU; LIU; XU, 2019).

Modificações estruturais nos principais grupamentos químicos da molécula originou derivados sintéticos que atualmente estão em investigação pré-clínica e clínica, como PG490-8, MRx102, LLDT-8, LLDT-67, LLDT-88, F60008, Minnelide e Omtritolide. Os resultados são promissores, principalmente para o tratamento de cânceres e doenças inflamatórias (CHEN *et al.*, 2018; HOU; LIU; XU, 2019).

Sistemas carreadores nanoestruturados também têm sido desenvolvidos como uma estratégia viável e de fácil acesso para permitir o uso terapêutico seguro da triptolida. Dentre as recentes aplicações, destaca-se àquelas direcionadas ao tratamento de cânceres e artrite reumatóide (XU, LIU, 2019). Um resumo dos nanocarreadores investigados nos últimos 10 anos é apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Sistemas carreadores nanoestruturados para veiculação de triptolida

<i>Nanocarreador</i>	<i>Objetivo ou patologia em estudo</i>	<i>Via de administração¹</i>	<i>Referência</i>
Carreador lipídico nanoestruturado	Artrite reumatoide	TD	(GU <i>et al.</i> , 2019)
	Estudos toxicológicos	VO	(GU <i>et al.</i> , 2018)
Etossoma	Eritema	T	(CHEN; LIU; GAO, 2010)
Lipossoma	Artrite reumatoide	TD e TG	(CHEN <i>et al.</i> , 2015)
	Nefropatia membranosa	IV	(YUAN <i>et al.</i> , 2017)
	Câncer pulmonar ortotópico	IP	(LIN <i>et al.</i> , 2018a)
Microemulsão	Estudos toxicológicos	TD	(XU <i>et al.</i> , 2008a)
	Desenvolvimento farmacotécnico	TD	(CHEN <i>et al.</i> , 2004, 2007, 2013)
	Edema e estudos toxicológicos	TD	(MEI <i>et al.</i> , 2003)
Nanoemulsão	Estudo farmacocinético	IV	(LI <i>et al.</i> , 2016)
	Dermatite/ eczema e estudos toxicológicos	TD	(YANG <i>et al.</i> , 2017)
Nanopartícula lipídica sólida	Estudos toxicológicos	IG	(XUE <i>et al.</i> , 2012)
	Estudos toxicológicos	VO	(GU <i>et al.</i> , 2018)
	Inflamação cutânea	TD	(GU <i>et al.</i> , 2018)
	Edema e estudos toxicológicos	TD e VO	(MEI <i>et al.</i> , 2003, 2005)
Nanopartícula polimérica	Câncer pancreático	-	(DING <i>et al.</i> , 2017)
	Artrite reumatóide	VO	(LIU <i>et al.</i> , 2005, 2008)
	Lesão pulmonar	IM	(HOYLE <i>et al.</i> , 2016)
	Artrite reumatoide	IV	(ZHANG <i>et al.</i> , 2018)
Micela polimérica	Carcinoma hepatocelular	IV	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
	Sarcoma	IV	(XU <i>et al.</i> , 2008b)
	Estudo farmacocinético e toxicológico	IV	(LI; WEN; DI, 2012; XU <i>et al.</i> , 2013)
	Carcinoma hepatocelular	IV	(LING <i>et al.</i> , 2014)
	Melanoma e angiogênese	IV	(WANG <i>et al.</i> , 2015a)
	Câncer de ovário	-	(WANG; LIU; LI, 2016)
	Câncer de próstata	IV	(XU <i>et al.</i> , 2018)
Câncer de cólon humano e leucemia	-	(ZHENG <i>et al.</i> , 2011)	
Nanopartícula híbrida lipídica-polimérica	Carcinoma oral e hepatoma	IV	(WU <i>et al.</i> , 2017)
	Câncer de pulmão	IV	(LIU <i>et al.</i> , 2018b)

¹Via de administração sugerida pelos autores ou utilizada nos estudos *in vivo*.

Abreviações: TD, via transdérmica; T, via tópica; IG, via intra-gástrica; IM, via intramuscular; IV, via intravenosa; IP, via intra-peritoneal; e VO, via oral.

Fonte: do autor, 2020.

Para aplicação tópica de triptolida destaca-se as nanoemulsões, microemulsões, nanopartículas e vesículas lipídicas (CHEN *et al.*, 2004; MEI *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010; XUE *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; YANG

et al., 2017). Tais estudos sugerem que o uso desses nanocarreadores proporcionou melhores perfis de permeação da triptolida com menor toxicidade, tanto a nível cutâneo como sistêmico (XU *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2017; XU, LIU, 2019).

A co-administração de triptolida com outras moléculas bioativas em nanocarreadores mostrou resultados terapêuticos mais pronunciados, quando comparado ao tratamento isolado. Micelas ou nanopartículas híbridas carregadas com triptolida e doxorubicina produziram efeito antitumoral sinérgico contra linhagem celular de câncer de próstata e carcinoma espinocelular de cavidade oral humana (WU *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018). De forma semelhante, a combinação de triptolida e celastrol em nanopartículas de fibroína de seda mostrou sinergismo antitumoral em diferentes linhagens de câncer de pâncreas (DING *et al.*, 2017). Lipossomas funcionalizados com anticorpos anti-anidrase carbônica IX e peptídeo de penetração celular (CPP33) demonstraram melhorar o direcionamento e atividade antitumoral da triptolida *in vitro* e *in vivo*, além de diminuir a toxicidade sistêmica (LIN *et al.*, 2018a).

1.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

1.4.1. Cristais líquidos

Os cristais líquidos (CL) compreendem um estado intermediário da matéria, localizado termodinamicamente entre o estado líquido isotrópico e o estado sólido cristalino. Eles exibem propriedades de fluxo como um líquido e, ao mesmo tempo, retêm parcialmente a ordem de um cristal (GARBOVSKIY; GLUSHCHENKO, 2010; MILAK; ZIMMER, 2015). Devido às suas características de auto-organização em nanoestruturas uni, bi ou tridimensionais, simetria e ampla área interfacial, os CLs ganharam atenção considerável da comunidade científica, principalmente após a década de 70, quando houve crescente desenvolvimento eletrônico, industrial e, posteriormente, nanotecnológico (GARBOVSKIY; GLUSHCHENKO, 2010; MITOV, 2014; MEZZENGA *et al.*, 2019; ZHAI *et al.*, 2019).

O estado líquido-cristalino pode ser obtido de duas maneiras fundamentalmente diferentes, levando a dois tipos básicos de CLs: termotrópico (CLT) e liotrópico (CLL). O primeiro tipo é formado por moléculas, ou mistura de moléculas, que apresentam anisotropia de forma (anisometria), e as diferentes estruturas e ordenamento local dessas moléculas individuais ocorrem em função da temperatura (e pressão) do material; enquanto que o segundo tipo é formado por misturas de

moléculas anfifílicas e solventes (geralmente água) que, em determinadas condições de temperatura, pressão e concentrações relativas dos diferentes componentes, apresentam a formação de superestruturas (agregados moleculares) que se organizam no espaço, exibindo algum grau de ordem (HYDE, 2001; DIERKING; AL-ZANGANA, 2017).

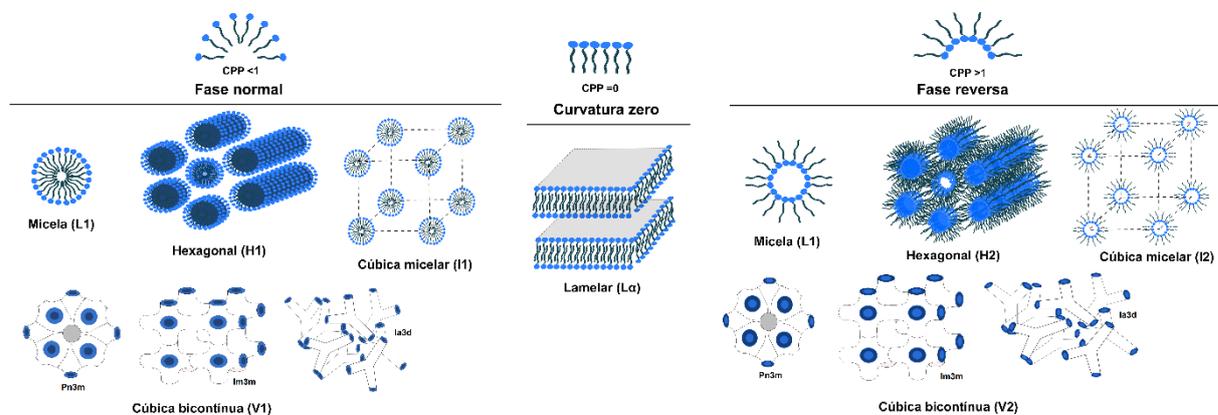
Os mesógenos (moléculas anfifílicas) em contato com a água se auto-organizam formando superestruturas para minimizar o contato entre a região apolar da molécula e o solvente polar, desta forma, o tipo de estrutura líquido-cristalina formada é governado pelo empacotamento molecular das moléculas de lipídios, que é refletido por seu parâmetro de empacotamento crítico (CPP, do inglês, *critical packing parameter*) (SEDDON; TEMPLER, 1995; HYDE, 2001; VAN'T HAG *et al.*, 2017; MEZZENGA *et al.*, 2019). Assim, o CPP é expresso como a razão entre o volume da cadeia hidrofóbica do anfifilo, a área do grupo de cabeça polar da seção transversal e o comprimento da cadeia lipídica. Como é comumente relatado, se o CPP estiver próximo de 1, há formação de agregado de interface planar (fase lamelar); quando <1 , as moléculas agregam-se ao tipo normal, e quando >1 , micelas invertidas são formadas (MILAK; ZIMMER, 2015; SILVESTRINI *et al.*, 2020). Ainda, o CPP pode ser influenciado por fatores elementares, incluindo a concentração e curvatura espontânea da molécula de lipídeo, bem como parâmetros ambientais, incluindo temperatura, teor de água, força iônica e pH (TAN *et al.*, 2019).

As principais mesofases e mais estudadas no campo biológico e biomédico incluem: lamelar (L), cúbica bicontínua ou descontínua (Q), e hexagonal (H), existindo como pares simétrico (tipo I ou normal), onde os lipídeos são agregados em uma matriz contínua de água; ou um sistema onde os grupos hidrofílicos hidratados encontram-se dispostos dentro de uma matriz apolar contínua composta pelas cadeias de hidrocarbonetos (tipo II ou invertido) (**Figura 6**). Além dessas mesofases, uma variedade de outras intermediárias tem sido propostas na literatura científica, tais como fase esponjosa e híbridas (SILVESTRINI *et al.*, 2020).

Resumidamente, na mesofase lamelar, a bicamada lipídica é disposta em uma rede unidimensional, separada por camadas de água, formando interfaces de curvatura zero. Fluidez e anisotropia na forma de mosaico planar e/ou cruces de malta são características dessa mesofase (CHAUDHARY; KANNOJIA; MISHRA, 2016; PHILIP, 2017). Por outro lado, a mesofase cúbica apresenta propriedades isotrópicas e alta viscosidade. É formada por uma bicamada lipídica curva, que se estende em

três dimensões, separada por dois canais congruentes de água, que possuem diâmetro de 5 nm quando o sistema está totalmente hidratado. Quando adicionado o excesso de água, a fase cúbica aparece como transparente, apresentando altas propriedades viscosa e elástica, gel isotrópico e termodinamicamente estável. Existe duas famílias de mesofases cúbicas, que apresentam perfis cristalográficos distintos, sendo: fase cúbica bicontínua ($Pn3m$, $Im3m$ e $Ia3d$) e fase cúbica micelar ($Fd3m$ e $Fm3m$) (MILAK; ZIMMER, 2015; SILVESTRINI *et al.*, 2020). A mesofase hexagonal consiste em um empacotamento denso de sete micelas cilíndricas, dispostas em uma rede hexagonal 2 D, podendo existir na forma normal ou inversa. Na forma inversa, a porção aquosa encontra-se contida nas micelas invertidas cilíndricas, com um diâmetro de 1 a 2 nm, e o espaço restante é ocupado pelas cadeias hidrofóbicas que se sobrepõem, deixando os cilindros mais próximos do que na fase hexagonal normal (HYDE, 2001; MILAK; ZIMMER, 2015).

Figura 6 - Principais mesofases líquido-cristalinas liotrópicas. Parâmetro crítico de empacotamento e a morfologia agregada resultante de acordo com a curvatura interfacial: $CPP < 1$ para tipo I, $CPP = 1$ para plano lamelar e $CPP > 1$ para estruturas do tipo II.



Fonte: modificado de SILVESTRINI *et al.* (2020).

A obtenção da mesofase líquida cristalina hexagonal torna-se possível, além das variações na concentração do solvente e da temperatura, pela incorporação de aditivos. Cada aditivo afeta a curvatura interfacial (dada pelo CPP) da bicamada lipídica de uma maneira diferente (FONG *et al.*, 2016). Geralmente, aditivos lipofílicos induzem uma transição de uma fase bicontínua cúbica para uma fase hexagonal reversa, tornando a curvatura interfacial média mais negativa. Já os aditivos mais hidrofílicos induzem a transição de uma fase bicontínua cúbica reversa para a fase lamelar, onde a curvatura média da interface muda para zero. Adicionalmente, as

mudanças na geometria molecular são usadas para explicar as transições de fase, bem como as transformações inter-cúbicas, nos sistemas lípideo-água (LI; JIANG; ZHANG, 2014; ZABARA; MEZZENGA, 2014; MILAK; ZIMMER, 2015; HUANG; GUI, 2018).

Além disso, quaisquer outros aditivos, incluindo a carga útil, podem modificar o empacotamento dos lipídios dentro da mesofase líquido-cristalina e induzir transições de fase (SILVESTRINI *et al.*, 2020). Em relação aos fármacos ou moléculas ativas, as interações com a bicamada lipídica devem ser otimizadas para que o fármaco não seja liberado prematuramente ou retido por muito tempo. São as dimensões das estruturas líquido-cristalinas liotrópicas que determinam a taxa de liberação do fármaco aprisionado (ZABARA; MEZZENGA, 2014). Uma série de estudos mostraram que moléculas anfifílicas apresentam um comportamento de liberação complexo, que depende da combinação do coeficiente de partição, da difusão da pelos canais de água e da difusão na bicamada lipídica. Por outro lado, as moléculas hidrofóbicas se dividem principalmente na bicamada lipídica e são caracterizadas por um intrincado comportamento de liberação, que depende principalmente de seu coeficiente de partição, da sua difusão na bicamada lipídica e difusão na água circundante. Por sua vez, as moléculas hidrofóbicas estão principalmente acomodadas no domínio lipofílico, e seu comportamento de liberação pode ser considerado puramente difusivo. A difusão pode ser dificultada pela via através dos canais aquosos e por interações com a superfície hidrofílica da bicamada lipídica. Desta forma, é comumente aceito que o comportamento de liberação de moléculas hidrofílicas depende fortemente das estruturas da mesofase devido às diferentes dimensões de seus domínios de água (NEGRINI; MEZZENGA, 2012; MILAK; ZIMMER, 2015; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

A fim de otimizar esses materiais como sistemas de entrega de medicamentos, essas interações podem ser perfeitamente ajustadas pela modificação da estrutura da mesofase, as interações eletrostáticas entre o fármaco e a superfície da bicamada lipídica e/ ou as dimensões dos domínios da água ou a sua interconectividade (SILVESTRINI *et al.*, 2020). Algumas das estratégias incluem a incorporação de lipídeos que alteram a mobilidade da bicamada lipídica, intensificadores de hidratação (por exemplo, octilglucosídeo, estearato de sacarose, colesterol e lipídeos aniônicos), proteínas formadoras de poros de membrana, combinação de lipídeos anfifílicos, ou ainda, através de estímulos intrínsecos e extrínsecos, como a utilização de componentes com sensibilidade térmica ou que alterem as temperaturas de transição,

componentes que respondem às mudanças de pH ou força iônica, uso de moléculas fotocrômicas ou nanopartículas plasmônicas ou magnéticas no sistema líquido-cristalino para indução de fase por meio da geração de calor ao absorver a energia luminosa ou eletromagnética (FONG; HANLEY; BOYD, 2009; LIU et al., 2013; LI; JIANG; ZHANG, 2014; NAZARUK et al., 2014, 2015; ZABARA; MEZZENGA, 2014; NEGRINI et al., 2015; FONG et al., 2016; HUANG; GUI, 2018; MERTINS; MATHEWS; ANGELOVA, 2020)

Nos últimos anos, uma variedade de lipídeos anfifílicos foi investigada como possíveis candidatos para obtenção de sistemas líquido-cristalinos. Os principais tipos de lipídeos anfifílicos empregados foram: monooleato de glicerila (ou monoleína), monolinoleato de glicerila (ou monolinoleína), fitantriol, monoelaidina, fosfatidiletanolamina e oleoiletanolamina, a fosfolipídios, fosfolipídios PEGuilados, alquilgliceratos e glicolipídios (SILVESTRINI *et al.*, 2020). Dentre eles, os sistemas baseados em monooleato de glicerila, monolinoleato de glicerila e fitantriol surgiram como candidatos ideais para a liberação sustentada de moléculas bioativas, principalmente devido ao seu rico polimorfismo e fácil acessibilidade (MILAK; ZIMMER, 2015; CHAUDHARY; KANNOJIA; MISHRA, 2016; AKBAR *et al.*, 2017).

O monooleato de glicerila ou monoleína, monoglicerídeo utilizado no presente estudo, é caracterizado por uma mistura de monoglicerídeos, glicerídeos do ácido oleico e outros ácidos graxos, consistindo principalmente por monooleato. Quimicamente, a cadeia acil do ácido oleico liga-se ao grupamento glicerol por uma ligação éster, e os dois carbonos restantes do glicerol possuem grupos hidroxila ativos, fornecendo características polares a esta porção da molécula. Já a cadeia hidrocarbônica fornece características hidrofóbicas ao monoglicerídeo (KULKARNI *et al.*, 2011). A formação das diferentes estruturas líquida-cristalinas com esta molécula ocorre pela hidratação das porções hidrofílicas pelo solvente hidrofílico, por meio das ligações de hidrogênio, enquanto que as cadeias alifáticas se agregam com base em interações de van der Waals. Como resultado, as fases ordenadas são obtidas, nas quais os domínios hidrofílico e hidrofóbico compõem o filme interfacial da mesofase, e o grau de ordem depende da proporção de monoleína em relação a um solvente adicionado (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011; MILAK; ZIMMER, 2015).

Na via tópica, a sua administração promove a extração da ceramida e melhora a fluidez dos lipídeos que constituem o estrato córneo, desta forma a monoleína auxilia a permeação de fármacos entre as camadas da pele (LOPES *et al.*, 2006; UCHINO

et al., 2019). Além disso, o uso dos sistemas líquido cristalinos apresenta várias vantagens em comparação com outros sistemas de administração tópica, como capacidade de proteger as moléculas incorporadas contra a degradação, apresenta domínios hidrofílicos e hidrofóbicos que fornecem um veículo ideal para moléculas com diferentes solubilidades, melhoram a solubilidade do medicamento na formulação, proporcionando assim um aumento da biodisponibilidade, além de minimizar possíveis efeitos tóxicos (ZHAI *et al.*, 2019; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

1.4.1.1. Nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs)

As mesofases lipídicas são termodinamicamente estáveis e, dependendo de sua simetria, muitas vezes podem coexistir com excesso de água, o que possibilita a formação de partículas estruturadas internamente por dispersão em excesso de meio aquoso. Na maior parte, as propriedades estruturais e funcionais das mesofases a granel são preservadas nas fases dispersas (FONG *et al.*, 2016). E desta forma, as NLCs têm sido projetadas para fornecer uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas ou de imagem (ZHAI *et al.*, 2019). No entanto, a sua produção é de maior complexidade quando comparada a produção dos CLLs a granel. Na literatura, duas abordagens são reportadas, que inclui *top-down* e *bottom-up* (MULET; BOYD; DRUMMOND, 2013; CHEN; MA; GUI, 2014).

A abordagem *top-down* foi relatada no fim da década de 90, e consiste inicialmente na hidratação do lipídeo anfifílico com a fase aquosa e estabilizantes. Em segundo passo, a fase cristalina formada, de viscosidade variável, requer níveis significativos de energia para desagregar e formar as dispersões estáveis sub-micrométricas (MILAK; ZIMMER, 2015). As forças de cisalhamento mais empregadas incluem a homogeneização de alta pressão e ultra-sonicação, outras técnicas também são empregadas, como centrifugação e extrusão de alta pressão (AKBAR *et al.*, 2017; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

Por outro lado, na abordagem *bottom-up*, condições da solução são projetadas para permitir a automontagem de lipídios para formar a estrutura de mesofase particulada a partir de uma solução molecular de fase única. Tipicamente, a porção lipídica é dissolvida num hidrótopo (geralmente etanol) antes da diluição para um meio aquoso de eleição (SPICER *et al.*, 2001). O hidrótopo é capaz de dissolver as moléculas lipídicas insolúveis em água em alta concentração, provocando uma rápida diminuição na solubilidade lipídica que impulsiona a precipitação do componente

lipídico. As partículas se formam e cristalizam a partir da solução precursora, após a adição de excesso de água contendo o estabilizante. Para remover o hidrótopo, a mistura é roto-evaporada (SPICER *et al.*, 2001; ANGELOVA *et al.*, 2017; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

Outros métodos, menos explorados, incluem os processos de evaporação de solvente e método da temperatura de inversão de fase. Na evaporação do solvente, a fase lipídica é combinada com um solvente volátil e uma solução com estabilizantes antes da emulsificação por sonicação. O tamanho das partículas também pode ser manipulado com a quantidade de solvente volátil incorporado. O método de emulsificação de temperatura de inversão de fase também pode representar uma abordagem alternativa de baixa energia para a síntese de NLCs. Neste processo a desidratação dos grupos cabeça polares dos lipídeos anfifílicos pela temperatura induz a mudanças na curvatura interfacial, assim, leva à formação de estruturas com curvatura negativa (TAN *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, as NLCs cúbicas e hexagonais foram investigadas como plataforma de entrega de medicamentos por diferentes vias, incluindo a via oral, ocular, nasal, pulmonar, periodontal, intravenosa, vaginal, tópica e transdérmica (MO; MILLERET; NAGARAJ, 2017; ZHAI *et al.*, 2019). Em particular, na via tópica, a entrega bem-sucedida de moléculas bioativas através da pele usando NLCs resulta de sua semelhança estrutural única com as microestruturas da pele, o que favorece a fácil difusão através do estrato córneo. Uma série de estudos foram revisados por Silvestrini *et al.* (2020), com destaque para a entrega cutânea de quimioterápicos, fotossensibilizadores, hormônios, anti-inflamatórios, agentes anti-aging e vacinas veiculados em mesofases a granel e/ou pelas NLCs (SILVESTRINI *et al.*, 2020).

A arquitetura altamente ordenada de canais de água através da matriz lipídica das NLCs e uma grande área de superfície externa fornecem uma plataforma ideal para o encapsulamento de moléculas lipofílicas, hidrofílicas e anfifílicas. Além disso, a mesoestrutura interna pode ser também modulada por meio de gatilhos físico-químicos, como temperatura, pressão, presença de aditivos, pH e composição lipídica e aquosa, promovendo modificações na encapsulação ou liberação de fármacos (ZABARA; MEZZENGA, 2014; FONG *et al.*, 2016; HUANG; GUI, 2018). Modificações estruturais com lipídeos e polímeros responsivos a biosinais específicos em microambientes celulares/ teciduais mostraram fornecer funcionalidades únicas a

essas NLCs (ZABARA; MEZZENGA, 2014; ZHAI *et al.*, 2019; MERTINS; MATHEWS; ANGELOVA, 2020).

Devido a essas multifuncionalidades, as NLCs compõem uma classe inovadora de plataformas de entrega de medicamentos, os chamados “nanocarreadores multifuncionais”. Os carreadores multifuncionais possuem a capacidade de suportar uma carga suficiente de um ou mais fármacos e/ou material genético, e carregá-los até o local-alvo. Na literatura, esses sistemas são divididos em três grandes grupos, sendo: (i) os carregados com fármacos que combinam pelo menos duas funções diferentes; (ii) os que apresentam as mesmas características anteriores, mas que carregam mais de um fármaco ou material genético; e (iii) os que carregam agentes terapêutico e de diagnóstico (teranósticos) (TEO *et al.*, 2016; HARE *et al.*, 2017). Esses sistemas multifuncionais têm sido investigados e aplicados, sobretudo, à terapia de cânceres (CHEN *et al.*, 2012; TEO *et al.*, 2016) e em alguns casos de doenças infecciosas (síndrome da imunodeficiência adquirida e malária) (WALVEKAR; GANNIMANI; GOVENDER, 2019), e na terapia de doenças dermatológicas, como a psoríase, os estudos ainda permanecem limitados (CORADINI *et al.*, 2015; BOAKYE *et al.*, 2017; DOPPALAPUDI; MAHIRA; KHAN, 2017; ROSA *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019)

Diante do exposto, considerando às implicações e dificuldade do tratamento da psoríase e o advento da nanotecnologia com a possibilidade de desenvolver carreadores multifuncionais, o presente estudo propõe a produção de nanodispersões líquida-cristalinas carregadas de triptolida e siRNA TNF- α visando o tratamento tópico da psoríase. Até a data, o uso da triptolida em nanodispersões líquida-cristalinas não foi reportada na literatura, demonstrando o caráter inovador do estudo e a grande importância de investigar a sua incorporação nesse sistema, além da associação com a terapia anti-sense, advinda das moléculas de siRNA direcionadas à citocina TNF- α . Desta forma, além de implicar em novas estratégias para o tratamento da psoríase, o desenvolvimento deste sistema propõe novos avanços para a tecnologia dos cristais líquidos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar as nanodispersões líquido-cristalinas como carreador multifuncional para co-administração tópica de triptolida e siRNA TNF- α .

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método analítico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação de triptolida;
- Desenvolver e produzir NLCs contendo triptolida e siRNA, bem como um hidrogel contendo as NLCs;
- Caracterizar as formulações (NLCs e NLCs-hidrogel) quanto as suas características físico-químicas e morfológicas;
- Caracterizar as propriedades reológicas do hidrogel contendo as NLCs;
- Caracterizar *in vitro* a cinética de liberação e os perfis de permeação e retenção cutâneas da triptolida e do siRNA veiculados nas formulações;
- Avaliar a viabilidade celular das NLCs;
- Avaliar a eficiência de internalização celular das NLCs;
- Elucidar o mecanismo de internalização e o tráfico intracelular das NLCs; e
- Avaliar a eficácia da terapia multifuncional *in vitro* em células induzidas a um processo inflamatório por exposição a lipopolissacarídeo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas

A monoleína (Myverol 18-99K) utilizada neste projeto foi cordialmente cedida pela Kerry Bio-Science (Irlanda). Ácido oleico (> 99% pureza), polímero poli(alilamina hidrocloreto) (PAH), triptolida (> 98% pureza), poloxamer 407, meio aquoso de montagem de lâminas Fluoromount™, corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), corante fluorescente rodamina 123, corante fluorescente lysotracker green DND-26, paraformaldeído, meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640; soro bovino fetal (SBF), solução antibiótica e antimicótica (10000 UI de penicilina; 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL), tripsina-EDTA (10x), dimetil-sulfóxido (DMSO), histopaque 1077, resazurina, azul de Tripam, iodeto de propídeo e lipopolissacarídeo (origem *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

O polímero hidroxietilcelulose (HEC) (Natrosol® 250 HHr) foi adquirido da Aqualon™ (Hopewell, Virginia). O Tissue-Tek® O.C.T. foi adquirido da Sakura Finetek (EUA). A agarose Ultrapure™, Opti-MEM e Lipofectamine 2000® foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, EUA). A heparina sódica (5000 UI/mL) foi adquirida da Blausiegel (Cotia, SP, Brasil). O corante fluorescente de ácidos nucléicos ultrasensível (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10000x) foi adquirido da Biotium, Inc. (Hayward, EUA). A água isenta de RNase (com dietilpirocarbonato), o siRNA *Silencer*® controle negativo, siRNA *Silencer*® conjugado com Alexa Fluor 647 e o siRNA *Silencer*® pré-desenhado TNF-α (código #AM16706) foram adquiridos da Ambion™ (Estados Unidos).

Os inibidores de vias endocíticas (filipina III de *Streptomyces filipinensis*; citocalasina D de *Zygosporium mansonii*; citocalasina B de *Drechslera dematioidea*; sacarose, metil-β-ciclodextrina, cloridrato de clorpromazina; difosfato de cloroquina, cloridrato de amilorida e azida sódica) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Os reagentes e anticorpos (reativos para humano) para TNF-α, IL-6, IL-1β e TGF-β (do inglês, *transforming growth factor-β*) foram adquiridos da BD Biosciences (Estados Unidos).

Todos os outros reagentes possuíam grau analítico. Água deionizada (Milli-Q Millipore Simplicity 185, Bedford, EUA) foi utilizada no preparo de todas as soluções.

3.1.2. Peles suínas

As peles suínas utilizadas nos experimentos *in vitro* foram obtidas das orelhas de porcos (espécie *Sus scrofa domesticus*) imediatamente após o abate do animal e previamente aos procedimentos de escaldagem (Frigorífico Frigodeliss Ltda; Capivari, SP).

As peles foram mantidas a aproximadamente 4 °C enquanto transportadas para o laboratório, onde foram higienizadas, dissecadas e congeladas (- 20 °C). As peles congeladas foram utilizadas no máximo em 15 dias.

3.1.3. Linhagens celulares

Para os estudos *in vitro* foram utilizadas a linhagem celular de queratinócitos humanos normais, HaCaT, disponível no banco celular do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O cultivo e manutenção da linhagem está descrito no item 3.2.6.1.1.

A cultura de monócitos humanos primários foi obtida após aprovação (CAAE: 29151420.9.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 527; Parecer Consubstanciado nº 4.062.866) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O material foi coletado após os voluntários sadios assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo). O isolamento e cultivo celular estão descritos no item 3.2.6.1.2.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de triptolida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.2.1.1. Padronização da metodologia e condições analíticas

O método analítico para quantificação de triptolida pela técnica de CLAE foi desenvolvido em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo SPD 10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com duas bombas (LC-10 AD VP), degaseificador a gás hélio, forno de coluna (CTD 10A VP) e detector Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (SPD 10A VP) operando a 218 nm. A aquisição e análise dos dados foram realizadas pelo *software* ClassVP Shimadzu®.

Durante o desenvolvimento do método diferentes condições analíticas foram avaliadas. A condição analítica que se mostrou adequada para prosseguir com a validação foi definida como: coluna de fase reversa C₁₈ (LiChroCART® 250-4 LiChrospher®, RP-18, 250 mm x 4,6 mm, granulometria de 5 µm; Merck, Darmstadt, Alemanha), fase móvel isocrática, previamente degaseificada com gás hélio, composta por acetonitrila e água MilliQ (70:30, v/v) acidificada com 0,02 % (v/v) de ácido ortofosfórico (pH 4,5), vazão da fase móvel de 0,9 mL/min, volume de injeção correspondente a 40 µL, forno da coluna a 25°C (temperatura ambiente) e tempo total de corrida fixado a 6 min.

Uma solução estoque de triptolida foi preparada em acetonitrila grau cromatográfico, na concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas as diluições aquosas necessárias para os demais ensaios.

3.2.1.2. Parâmetros de validação

A validação do método foi realizada conforme os parâmetros estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada nº 166 (2017) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e recomendações da *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). Os ensaios foram realizados para seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção e quantificação, recuperação em matriz e robustez.

3.2.1.2.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada para diferentes amostras de modo a verificar possíveis interferências em amostragens futuras: (i) fase móvel; (ii) solução receptora da célula de Franz (tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2); (iii) formulação de estudo e (iv) matriz biológica homogeneizada em acetonitrila.

Para o ensaio com a matriz biológica, aproximadamente 2 g da pele suína (dermatomizada a 500 µm) foram picotadas, adicionadas de 5,0 mL de acetonitrila e trituradas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Marconi, Turrax MA102, Brasil) por um minuto. Em seguida, a dispersão resultante foi filtrada (membrana Millipore® poro de 0,22 µm) e injetada no cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1.). Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.1.2.2. Linearidade

Para a construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método, foram preparadas a partir da solução estoque de triptolida (100 µg/mL) diluições em água ultra-pura, nas respectivas concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 12,5 µg/mL. Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1.). Este ensaio foi realizado em triplicata e por três dias consecutivos.

A partir dos resultados encontrados, foram construídas as curvas analíticas relacionando a área dos picos (eixo das abscissas) *versus* suas respectivas concentrações (eixo das ordenadas). A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, em que (*a*) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (*b*) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das abscissas. A faixa linear de trabalho determinada por intermédio do coeficiente de determinação (R^2) e aceito quando acima de 0,99 (Art. 23, Seção II, RDC nº 166/ 2017, ANVISA).

A distribuição e análise de resíduos foi realizada pelo teste de Durbin Watson utilizando o *software* MiniTab® 2017, o qual foi aplicado para detectar a presença de autocorrelação (dependência) entre os resíduos de uma análise de regressão; e o teste de ajuste (*Lack-of-fit*) seguido pelo teste de Anderson-Darling, para avaliar a distribuição dos dados individualmente.

3.2.1.2.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas intra- e inter-dias. Para tanto, foram preparadas de maneira independente três concentrações de triptolida em diferentes níveis (baixo, médio e alto) contemplando o intervalo linear do método, sendo: 0,5; 2,5 e 10 µg/mL.

A precisão intra-dia foi determinada injetando três réplicas de cada concentração em um mesmo dia, sendo calculada matematicamente pela Equação 1 e expressa em porcentagem pelo coeficiente de variação (CV) entre os pontos injetados.

$$CV (\%) = \frac{DP}{x} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que: DP = desvio padrão; x = área dos picos

A exatidão intra-dia foi calculada a partir dos valores de concentrações mensurada e teórica (Equação 2), sendo expressa pela porcentagem de recuperação (Rec).

$$Rec (\%) = \left(\frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Para determinação da precisão e exatidão inter-dia, o mesmo procedimento foi tomado, sendo que, as amostras foram injetadas três vezes por três dias consecutivos. Todos os dados obtidos foram apresentados pela média ± DP.

3.2.1.2.4. Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) foram determinados a partir de soluções preparadas em concentrações de triptolida a 0,05; 0,025 e 0,01 µg/mL. Para isso, as amostras foram preparadas de forma independentes e injetadas 10 vezes no cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1). Os dados obtidos foram apresentados pela média ± DP.

Os resultados foram analisados e o LQ foi obtido para o menor nível determinável com precisão e exatidão dentro dos níveis de aceitação previamente

estipulados pelas normas de validação. O LD foi determinado visualmente, pela razão sinal ruído $\geq 2:1$.

3.2.1.2.5. *Teste de recuperação em matriz*

Para determinar a capacidade de extração do analito em uma matriz e a porcentagem de recuperação mensurada pelo método analítico, a matriz (pele suína) foi tratada com concentrações pré-determinadas de soluções padrão de triptolida em acetonitrila.

Inicialmente as peles suínas dermatomizadas a 500 μm ($n = 3$) foram apoiadas ao fundo de tubos de ensaio e adicionados 50 μL de soluções de triptolida em acetonitrila nas concentrações de 100; 25 e 5 $\mu\text{g/mL}$. As peles foram mantidas durante 30 min em fluxo laminar para que a acetonitrila evaporasse, e em seguida a pele foi triturada e adicionados 4,5 mL de acetonitrila (concentração final de triptolida 10; 2,5 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) para extração da triptolida residente na matriz. A mistura foi levada a um homogeneizador de tecido (Marconi, Turrax MA102, Brasil) por um minuto e ultrassom (QUIMIS[®], Q3350, Brasil) por 15 min, filtrada (membrana Millipore[®] poro de 0,22 μm) e injetada no cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1.).

Os experimentos foram realizados em triplicata e a porcentagem de triptolida determinada em relação à quantidade total adicionada foi considerada como sendo a porcentagem de recuperação, calculada matematicamente pela equação 2. Os dados obtidos foram apresentados pela média \pm DP.

3.2.1.2.6. *Robustez*

Para a avaliação da robustez do método, foram realizadas variações nas condições analíticas, como vazão da fase móvel (0,85 e 0,95 mL/min), proporção da fase móvel (65:25 e 75:15, v/v) e comprimento de onda (λ 217 e 219 nm).

Para cada parâmetro alterado foram realizadas curvas analíticas em triplicata independentes e os resultados foram avaliados em relação às mudanças no tempo de retenção da triptolida e na amplitude do pico. Todos os dados obtidos foram apresentados pela média \pm DP.

3.2.2. Desenvolvimento das NLCs

3.2.2.1. Obtenção

Os géis precursores da fase líquido-cristalina hexagonal reversa composto por monoleína, ácido oleico e fase aquosa (8:1:90, m/m/m) foram preparados utilizando método previamente descrito (LOPES *et al.*, 2006; ROSSETTI *et al.*, 2011) com modificações. Resumidamente, a monoleína fundida (42 °C) foi misturada com o ácido oleico na presença ou não de triptolida (0,04%, m/m), e em seguida, a fase aquosa (composta de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0 com 1% de poloxamer 407) juntamente com 0,5% (m/m) de polímero catiônico PAH pré-solubilizado, foi adicionada.

O gel formado em excesso de fase aquosa foi mantido à temperatura ambiente por 24 h, ao abrigo da luz. Após esse período, para obtenção das NLCs, o gel foi previamente submetido a 1 minuto de agitação em agitador de tubos (IKA®, Vortex Genius 3, Brasil), seguido de 1 minuto de sonicação (sonicador de agulha Bandelin Eletronic, UW2200, Berlin) a 30% de potência máxima, sob banho de gelo. Após a sonicação, obteve-se uma dispersão leitosa, de baixa viscosidade e anisotrópica.

Para os ensaios com siRNA, quantidades exatas de NLCs e siRNA foram misturadas e mantidas em equilíbrio por 30 minutos em temperatura ambiente para interação eletrostática. A concentração de siRNA foi determinada de acordo o requerido para cada ensaio, sendo mencionada na descrição de cada ensaio.

3.2.2.2. Avaliação da incorporação do polímero catiônico nas NLCs em diferentes concentrações

Para determinar a mínima concentração de PAH necessária para promover uma carga superficial positiva às NLCs, foi incorporado ao sistema líquido-cristalino concentrações de PAH variando de 0,1 a 2,5% (m/m). Neste ensaio o sistema líquido-cristalino foi preparado nas proporções anteriormente relatadas. Ao final, a carga superficial foi medida pelo potencial zeta, como descrito no item 3.2.3.1. Os dados obtidos foram apresentados pela média \pm DP.

3.2.2.3. Produção de hidrogel contendo as NLCs

De forma a aumentar a viscosidade da dispersão incorporou-se o polímero HEC 1% (m/v) e submeteu-se a agitação magnética constante a 400 rpm por 3 h em

temperatura ambiente (ROSSETTI *et al.*, 2011). O hidrogel formado foi mantido em equilíbrio por 24 h para então, ser utilizado nos ensaios.

3.2.3. Caracterização físico-química das NLCs

3.2.3.1. Análise do diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio e a homogeneidade da distribuição de tamanho de partícula, dado pelo índice de polidispersão (do inglês, *Polydispersity Index*, PDI) foram determinados por espalhamento de luz dinâmico pelo equipamento Zetasizer Nano System ZS e os dados processados pelo *software Zetasizer versão 7.10* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Uma alíquota das NLCs foi diluída em água MilliQ (1:400, v/v) e colocada em celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram realizadas em temperatura ambiente (25 °C). O equipamento possui um laser de HeNe de 4mW operando em um comprimento de onda de 633 nm e realiza medições não invasivas por “*back scatter optics*”, em média de 12 determinações para cada análise. As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da cubeta é automaticamente determinada pelo *software* do equipamento. Os dados obtidos representam os valores médios de três medições independentes (média ± DP).

O potencial zeta das NLCs também foi medido no equipamento Zetasizer Nano System ZS e os dados processados pelo *software Zetasizer versão 7.10* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Neste ensaio, o potencial zeta é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/ gotículas dispersas submetidas a um campo eletroforético. Uma alíquota das NLCs foi diluída em água MilliQ (1:400, v/v) e colocadas em células com dois eletrodos. Os dados obtidos representam os valores médios de três medições independentes (média ± DP).

3.2.3.2. Análise da eficiência de encapsulação da triptolida

A quantificação de triptolida encapsulada nas NLC TP foi determinada pelo método de ultra-filtração/ centrifugação, utilizando dispositivo de ultra-filtração constituídos de celulose regenerada de 50 kDa (Amicon - Millipore®, Darmstadt, Alemanha). Exatamente 1 mL das NLCs foram individualmente adicionados a unidade

de filtro seguido de centrifugação a $3000 \times g$ (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburg-Eppendorf, Alemanha) por 5 min a 25°C . A triptolida não encapsulada foi coletada no ultrafiltrado e posteriormente quantificada em CLAE (item 3.2.1.1.). Assim, a eficiência de encapsulação (EE, %) foi calculada utilizando os valores da concentração teórica e da concentração mensurada, de acordo com a Equação 3.

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{Concentração mensurada} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Os dados obtidos representam os valores médios de três medidas para três formulações independentes (média \pm DP).

3.2.3.3. Análise da eficiência de complexação e integridade do siRNA liberado das NLCs

3.2.4.3.1. Preparo do gel de agarose 2% e condições eletroforéticas

A eficiência de complexação do siRNA nas NLCs e integridade do siRNA liberado do complexo com as NLCs foram avaliadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Para isto, o gel de agarose 2% (m/v) foi preparado com 1,2 g de agarose em 60 mL de tampão Tris-acetato-EDTA (1x, pH 8,0). A agarose foi solubilizada no tampão sob aquecimento e vertida na placa de corrida para total polimerização.

Após o preparo e adição as amostras (10 μL /poço) no gel, a corrida eletroforética (Electrophoresis Power Supply, UK) foi realizada em cuba horizontal contendo tampão Tris-borato-EDTA (1x, pH 8,0), a uma tensão constante de 100 V, amperagem de 400 mA, por 20 min. Ao final, a visualização das bandas foi realizada sob um *Transluminator* (Loccus Biotechnology, Brasil) e a aquisição de imagens foi obtida usando o *software* QuantityOne.

3.2.3.3.2. Preparo das amostras para o ensaio de complexação do siRNA

Para avaliação da complexação do siRNA nas NLCs as amostras foram preparadas para um total de 10 μL , volume mínimo necessário para aplicação no gel. O siRNA a uma concentração final de 5 μM foi incubado por 30 min com as NLCs. Após este tempo, adicionou-se 1 μL do corante fluorescente de ácidos nucleicos ultrasensível e as amostras foram adicionadas em cada poço do gel.

Para este ensaio os controles positivo e negativos foram: siRNA (5 μ M), água isenta de RNase e NLCs.

3.2.3.3.3. *Preparo das amostras para o ensaio de liberação/ integridade do siRNA*

Para avaliação da integridade do siRNA liberado pelas NLCs, realizou-se o ensaio de competição com poliânions de heparina (SCHOLZ; WAGNER, 2012; KRIEG *et al.*, 2015).

Para isso, as amostras foram preparadas como descrito anteriormente (item 3.2.3.4.2) e após o período de complexação entre as NLCs e o siRNA, o complexo foi incubado com 10 μ L de heparina sódica (5000 UI/ mL) por 60 min a 37 °C. Ao final do preparo, adicionou-se às amostras 1 μ L do corante fluorescente de ácidos nucleicos ultra-sensível.

Os controles positivos e negativos preparados para este ensaio foram: siRNA (5 μ M) com heparina, heparina livre e NLCs com heparina.

3.2.3.4. *Análise do rastreamento de partículas*

A análise de rastreamento de partículas (do inglês, *Nanoparticle tracking Analysis*; NTA), realizada pelo equipamento Nanosight NS300 (Malvern, Reino Unido) acoplado com câmera de alta sensibilidade e módulo de laser de 642 nm, foi realizada para determinar a concentração de NLCs (densidade do número de partículas). As NLCs foram diluídas (1:5000, v/v) em água MilliQ e injetadas na câmara da amostra com uma seringa estéril (BD Plastioak, Paraná, Brasil). As medições foram realizadas a 25 °C e os resultados foram processados pelo *software* NTA 3.1 Build 3.1.54.

3.2.3.5. *Análise por espalhamento de raios-X a baixo ângulo*

A análise por espalhamento de raios X a baixo ângulo (do inglês, *Small-Angle X-ray Scattering*; SAXS) no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP-SP; SP, Brasil)

As medições foram realizadas utilizando uma câmera de raios X de baixo ângulo Xeuss[®] 2.0 da Xenocs, disponível no laboratório do Grupo de Fluidos Complexos do IFUSP. Este equipamento possui fonte de raios X microfoco (Cu K α), espelhos, 2 colimadores de baixo espalhamento e detector Pilatus. As amostras foram colocadas em capilares cilíndricos de vidro com diâmetro interno de 2,0 mm e posteriormente colocadas em cases de aço e vedadas com tampas removíveis. A

curva de espalhamento de um capilar vazio foi usada como dispersão de fundo, a qual foi removida das intensidades de espalhamento da amostra, após a correção da transmissão. O tempo de aquisição de cada curva de espalhamento foi de 1 hora a 23 °C (temperatura controlada).

Com o *software* do equipamento a curva foi integrada a fim de gerar um arquivo de intensidade em função de 2θ (ângulo de espalhamento) ou em q (vetor de espalhamento) (Equação 4).

$$q = \frac{4\pi \text{sen}\theta}{\lambda} \quad \text{(Equação 4)}$$

As estruturas líquido-cristalinas foram determinadas calculando os valores das distâncias interplanares, d , da lei de Bragg (Equação 5). Nesta equação, q e θ são o vetor de espalhamento e o ângulo do raio incidente, respectivamente, λ é o comprimento de onda do feixe de raios X e d é a distância interplanar:

$$2d \text{sen}\theta = n \times \lambda \quad \text{(Equação 5)}$$

Uma nova equação (6) é obtida a partir da combinação das equações 4 e 5:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{(Equação 6)}$$

Neste trabalho, os padrões de espalhamento foram obtidos plotando as intensidades de espalhamento em função do vetor de espalhamento, e partir desses dados foram calculados as razões entre as distâncias interplanares e os parâmetros de rede (DONG; BOYD, 2011).

3.2.3.6. Estudos de estabilidade física e química das NLCs

A estabilidade físico-química das NLC e NLC TP ($n = 3$) foram determinadas durante um período de 90 dias, sob diferentes condições: (a) baixa temperatura (4°C); (b) temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C); e (c) alta temperatura (40 °C), conforme recomendado na literatura especializada (ADAIR; BERRY; MCGREAL, 1996; ICH; GUIDELINE, 2003; ANVISA, 2012).

Medições do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão, potencial zeta (item 3.2.4.1.) e o conteúdo de triptolida encapsulada (item 3.2.4.2.) foram realizadas como parâmetros de avaliação da estabilidade. Os dados obtidos representam os valores médios de três medidas para três formulações independentes (média \pm DP).

3.2.3.7. Estudo do comportamento reológico dos hidrogéis contendo as NLCs

Os hidrogéis de HEC 1% contendo ou não as NLCs foram submetidos aos estudos de comportamento reológico utilizando um reômetro modelo Discovery Hybrid Rheometer HR-2 da TA Instruments (New Castle, DE) equipado com dispositivos de placa e cone, controle de temperatura por sistema Peltier e *software* Rhocalc, disponível no Laboratório de Farmacotécnica Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Neste ensaio as amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior utilizando espátula, de modo a evitar cisalhamento das amostras. As curvas de fluxo ascendente foram obtidas com gradiente de cisalhamento, no intervalo de 0 a 1000 s⁻¹, no período de 150 s e mantido o cisalhamento máximo por 20 s. Após este período iniciou a curva descendente em condição inversa a ascendente. Os dados foram processados pelo *software* TRIOS do equipamento (TA Instruments, New Castle, DE), e as curvas ascendentes foram ajustadas aos modelos matemáticos Newtoniano, Bingham, Casson, Power Law e Herschel-Bulkley pelo mesmo *software*.

As análises foram realizadas para as formulações preparadas 24 h antes: hidrogel sem NLCs (HEC em água MilliQ), hidrogel com triptolida (pré-solubilizada em propilenoglicol), NLC-hidrogel e NLC TP-hidrogel, em temperatura controlada de 32 °C. Os dados obtidos representam os valores médios de três replicatas (média \pm DP).

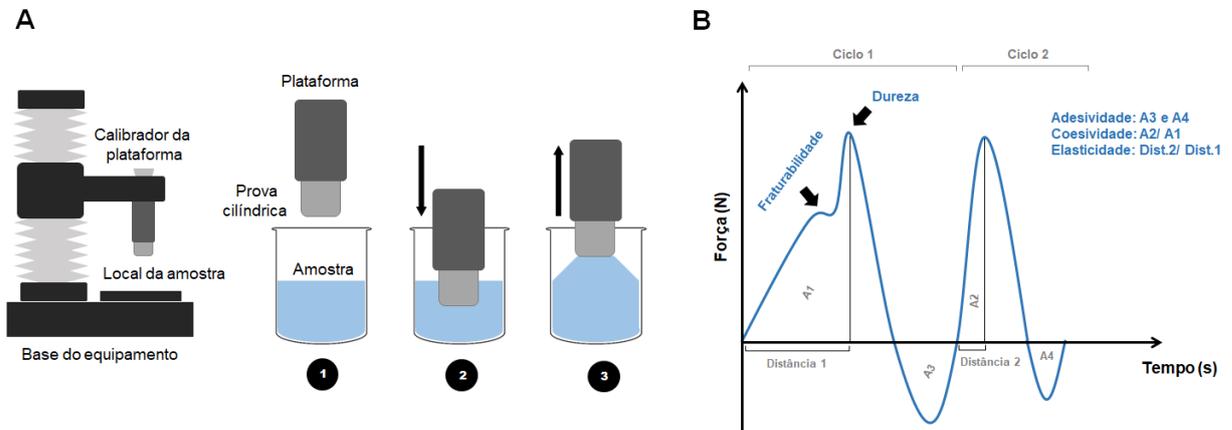
3.2.3.8. Análise do perfil de textura dos hidrogéis contendo as NLCs

As propriedades mecânicas dos hidrogéis de HEC 1% contendo ou não as NLCs foram avaliadas a partir da análise do perfil de textura utilizando um analisador de textura modelo TA-XT *plus* da Stable Micro System® (Surrey, Reino Unido), no modo de força em compressão, disponível no Laboratório de Farmacotécnica Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

As formulações foram acondicionadas em béqueres idênticos de 10 mL a uma altura fixa, evitando-se a introdução de bolhas de ar. Foi utilizada uma prova analítica cilíndrica de 10 mm de diâmetro no interior da amostra movida com velocidade de 1 mm/s, profundidade de 15 mm e velocidade de retorno de 2 mm/s (**Figura 7 A**). A partir dos dados obtidos, o gráfico resultante da força (N) *versus* o tempo (s) (**Figura 6 B**) foi plotado pelo *software* Exponent (Stable Micro System, Surrey, Reino Unido), e as propriedades mecânicas como compressibilidade, adesividade e coesividade puderam ser calculadas. Os dados obtidos representam os valores médios de três replicatas (média \pm DP)

Este ensaio foi realizado para as seguintes formulações preparadas 24 h antes: hidrogel sem NLCs (HEC em água MilliQ), hidrogel com triptolida (pré-solubilizada em propilenoglicol), NLC -hidrogel e NLC TP-hidrogel.

Figura 7 - Representação ilustrativa do processo de análise do perfil de textura. [A] A prova cilíndrica fixada no equipamento após a calibração (1) é movida em direção à formulação (2) a uma velocidade de 1 mm/s, durante 10 s, em seguida a prova cilíndrica é movida para cima (2 mm/s) até a ruptura entre a formulação e a prova (3). [B] Curva típica obtida para a análise do perfil de textura.



Fonte: do autor, 2020.

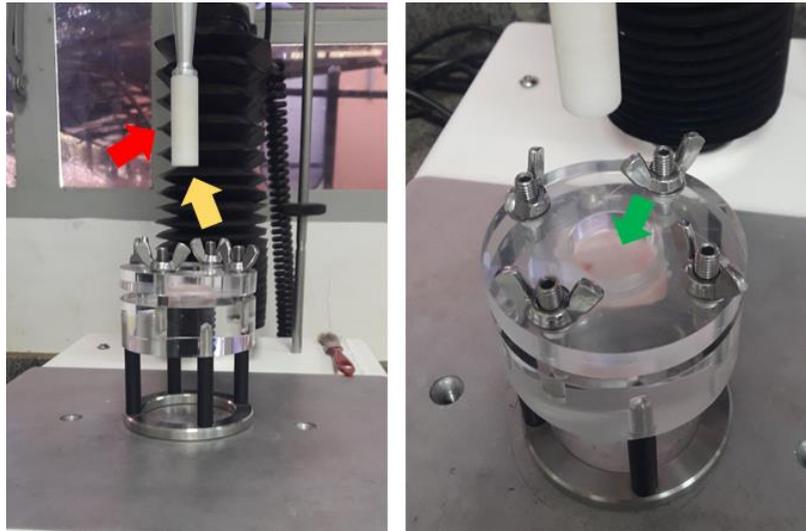
3.2.3.9. Estudos de bioadesividade dos hidrogéis contendo as NLCs

A força de bioadesividade dos hidrogéis formados com as NLCs também foram avaliadas utilizando um analisador de textura modelo TA-XT *plus* da StableMicro System® (Surrey, Reino Unido), no modo de força em compressão, disponível no Laboratório de Farmacotécnica Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Neste ensaio, inicialmente um disco de acrílico foi revestido com um fragmento circular de pele suína (previamente dissecada) e preso com um anel de compressão

com um diâmetro de 13 mm. As amostras foram pesadas (0,5 g) e adicionadas no corpo da prova, que foi fixado ao acessório superior (**Figura 8**).

Figura 8 - Representação ilustrativa do analisador de textura para análise de bioadesividade. A prova cilíndrica (seta vermelha), contendo a amostra (seta amarela), fixada no equipamento após a calibração é movida em direção à membrana biológica (seta verde) a uma velocidade de 1 mm/s, durante 10 s, em seguida a prova cilíndrica é movida para cima (1 mm/s), até a ruptura entre a formulação e a membrana.



Fonte: do autor, 2020.

Em seguida, o acessório superior do equipamento foi movimentado para baixo até tocar a superfície da pele, mantendo compressão de 0,5 N por 1 min. Após este período, o acessório foi movimentado para cima (módulo de tensão) a velocidade constante de 0,1 mm/seg até que o corpo de prova se destacasse da pele. A força necessária para destacar a amostra da pele ou força de adesão (F_A , N), e o trabalho de bioadesividade referente à área sob a curva de força em relação a distância (TA, N x mm), foram determinadas pelo *software* Exponent[®] (Stable Micro System, Surrey, Reino Unido).

Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente para todas as amostras, sendo: hidrogel sem NLCs (HEC em água MilliQ), hidrogel com triptolida (pré-solubilizada em propilenoglicol), NLC-hidrogel e NLC TP-hidrogel. Os dados obtidos representam os valores médios de cinco replicatas (média \pm DP).

3.2.4. Caracterização morfológica das NLCs

3.2.4.1. Análise por microscopia de luz polarizada

A identificação das fases cristalinas líquidas antes da dispersão sob alta energia foi observada após 24 h, à temperatura ambiente (25°C) em microscópio óptico (Axioplan 2, ImagePol, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com um filtro polarizador e acoplado a uma câmera digital (AxioCamHRc, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com um sistema de vídeo e aquisição automática de imagens.

3.2.4.2. Análise por microscopia de força atômica

As análises morfológicas por microscopia de força atômica (do inglês, *Atomic Force Microscopy*; AFM) foram realizadas no equipamento *Scanning Probe Microscope* modelo SPM-9600, da Shimadzu e *software* SPM Online, fornecido pela Shimadzu, disponível no Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Em uma superfície de mica foi depositada e espalhada 5 µL da amostra (NLC e NLC TP) previamente diluída em água ultra-filtrada (1:400, v/v). O substrato de mica com a amostra permaneceu por 2 h em temperatura de 25 °C para secagem lenta, e em seguida colocada por 48 h em dessecador a 25 °C.

Todas as medições foram realizadas com um *cantilever* de silício de 124 µm de comprimento, operando no modo contato intermitente, em frequência de ressonância entre 324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante.

Os resultados dimensionais foram processados usando o próprio *software* do equipamento. No mínimo dez imagens de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis.

3.2.5. Estudos *in vitro* em célula vertical de Franz

3.2.5.1. Liberação cutânea em membrana sintética

Para avaliação do perfil de liberação da triptolida nas formulações, foi utilizado membranas sintéticas de acetato de celulose (1200 a 1400 Da, Fisherbrand) em uma célula vertical de difusão de Franz (Hanson Instruments, EUA) com uma área de difusão de 1,77 cm². O compartimento receptor foi composto por 7 mL de tampão

fosfato de sódio 0,01 M (pH $7,2 \pm 0,2$), mantido a 32 °C (temperatura controlada) e agitação constante (400 rpm) durante todo o período de análise (PRAÇA *et al.*, 2018).

No compartimento doador foram aplicados exatamente 500 µL da solução de triptolida (propilenoglicol:água, 1:5, v/v), 500 µL de NLC TP, 0,5 g de TP-hidrogel e 0,5 g de hidrogel-NLC TP. A quantidade de cada formulação representa 166,6 µg de triptolida. Após 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas, a solução receptora foi coletada (1 mL) e quantidade de triptolida foi determinada em cromatógrafo líquido pelo método analítico validado (item 3.2.1.1). Este ensaio foi realizado sob condições *Skin* e dose infinita.

A equação 7 foi usada para calcular a quantidade de triptolida presente no compartimento receptor.

$$Q_{real,t} = C_{m,t} \cdot V_r + V_\alpha \cdot \sum^{n-1} C_\alpha \quad \text{(Equação 7)}$$

Nesta equação, $Q_{real,t}$ compreende o valor acumulado no tempo em questão; $C_{m,t}$ é a concentração determinada no tempo em questão; V_r e V_α são os volumes presentes na célula de difusão e o volume removido, respectivamente; e C_α é a concentração da amostra removida.

Os dados obtidos foram plotados graficamente relacionando a concentração ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* o tempo (h), e estes representam os valores médios de cinco replicatas (média \pm DP).

A cinética de liberação da triptolida pelas formulações foram ajustadas aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

O melhor modelo a representar a cinética de liberação foi considerado aquele com maior valor de coeficiente de correlação linear (R^2) (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

3.2.5.2. Permeação cutânea em membrana biológica

Os estudos de permeação *in vitro* foram realizados de acordo com a Diretriz OECD 428 (2004), usando a pele da orelha de porco como membrana biológica animal. A pele higienizada e dissecada foi cuidadosamente dermatomizada (dermatômetro Nouvag® AG TCM 3000, Suíça) em uma espessura de 500 µm e os fragmentos de aproximadamente 4 cm² foram montados nos sistemas de células

verticais de difusão de Franz (**Figura 9 A**). As condições experimentais (temperatura de 32 °C e agitação constante de 400 rpm), amostras em estudo e tempos de amostragens foram realizadas igualmente ao ensaio anterior (item 3.2.5.1.).

Após obtenção gráfica dos resultados, parâmetros cinéticos de permeação, como fluxo, *lag time*, coeficiente de permeação foram calculados. Os dados obtidos representam os valores médios de cinco replicatas (média ± DP).

3.2.5.3. Retenção cutânea em membrana biológica

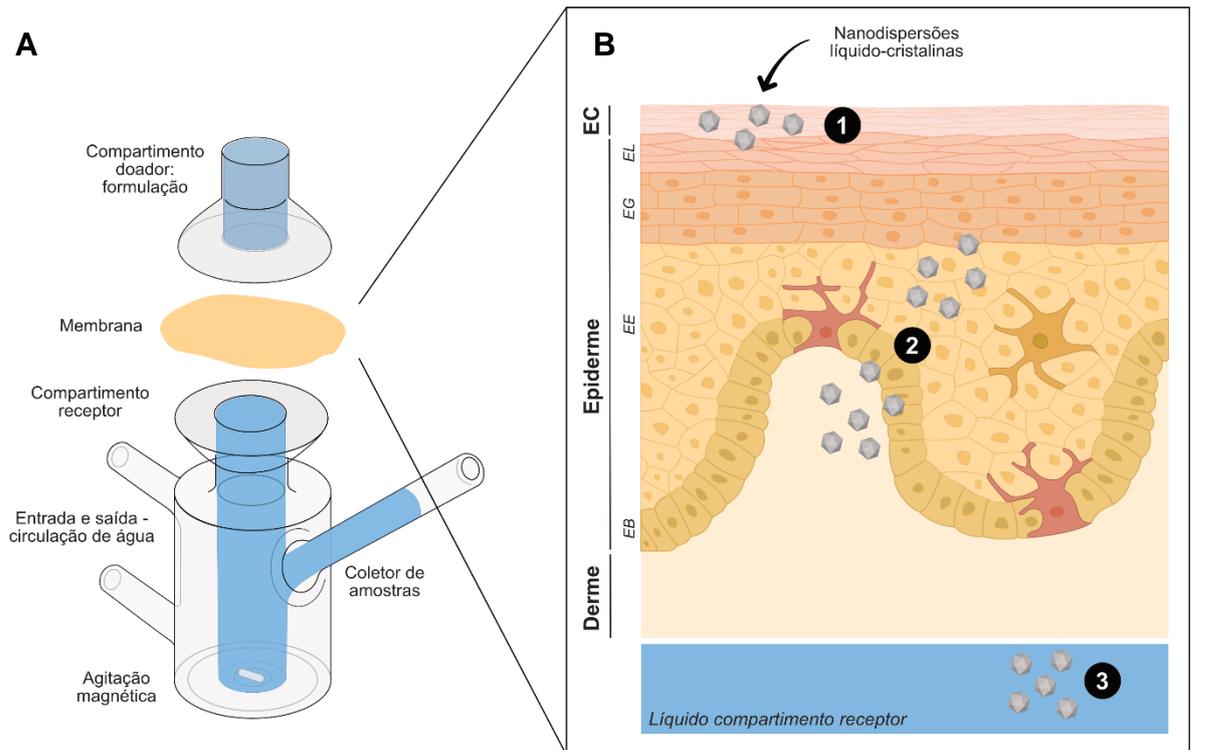
3.2.5.3.1. Análise quantitativa pela técnica de *tape-stripping*

Para estudar o perfil de penetração/ retenção da triptolida entre as camadas da pele suína (estrado córneo, epiderme e derme viável) (**Figura 9 B**) foi empregada a técnica de *tape stripping*. Resumidamente, o estrato córneo é removido por uma sequência de 15-20 fitas adesivas, e estas fitas submetidas a um processo de extração, para que o analito de interesse seja quantificado por um método analítico adequado (LADEMANN *et al.*, 2009; PRAÇA *et al.*, 2018).

Desta forma, para este ensaio, os fragmentos de 4 cm² da pele suína dermatomizada (500 µm) foram montados nos sistemas de células verticais de difusão de Franz, e realizou-se o ensaio sob as mesmas condições experimentais anteriores (item 3.2.5.1.). Ao final de cada tempo pré-determinado (2, 4, 6, 8 e 12 horas) as peles (n = 5) foram removidas da célula vertical de difusão de Franz e as superfícies foram cuidadosamente lavadas com água MilliQ, para remoção do excesso de formulação. Em seguida, foram submetidas ao *tape stripping*, com 15 fitas adesivas. As fitas adesivas foram misturadas em uma quantidade exata de acetonitrila para extração da triptolida e então, a solução de extração foi submetida à análise em cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1) (**Figura 9 C**).

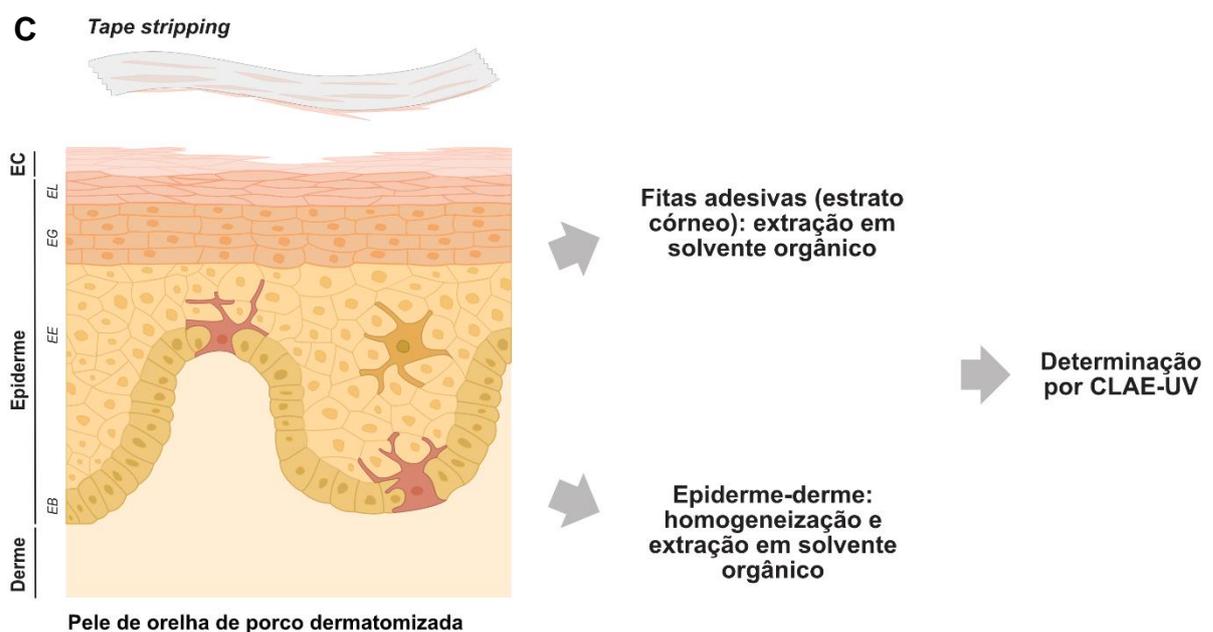
O restante da pele (epiderme e derme-viável) em acetonitrila foi submetido à homogeneização (homogeneizador de tecidos, modelo Turrax MA102, Marconi, Brasil) por um minuto e banho de ultrassom (modelo Q3350, QUIMIS®, Brasil) por 20 min. Em seguida a suspensão obtida foi filtrada (membrana Millipore® poro de 0,22 µm) e analisada em cromatógrafo líquido (item 3.2.1.1) (**Figura 9 C**). Os dados obtidos representam os valores médios de seis replicatas (média ± DP).

Figura 9 – Representação ilustrativa da célula vertical de difusão de Franz e os ensaios de permeação e retenção cutâneas. [A] Componentes que compõem a célula vertical de difusão. [B] Camadas da pele como referência a pele de orelha de porco dermatomizada a 500 µm utilizada nos ensaios, e a localização das NLCs em cada ensaio: (1) fração do EC e (2) fração epiderme-derme obtidas pela técnica de *tape-stripping*; e em (3) conteúdo permeado determinado no compartimento receptor. [C] Técnica de *tape stripping* e extração da triptolida presente na fração tecidual do EC e na fração da EP+D para quantificação utilizando CLAE UV-Vis.



Célula vertical de difusão de Franz

Pele de orelha de porco dermatomizada



Fonte: do autor, 2020.

3.2.5.3.2. Análise qualitativa por microscopia confocal de varredura a laser

A intensidade e profundidade de penetração na pele das NLC TP, foram investigadas por microscopia confocal de varredura a laser (do inglês, *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM), que permite a visualização mediante a complexação das NLCs com siRNA marcado com Alexa Fluor 647, um corante fluorescente vermelho brilhante com excitação e emissão máximas a 652 nm e 670 nm, respectivamente.

As análises foram realizadas no microscópio CLSM, modelo Leica TCS SP8 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) equipado com laser HeNe 633 nm e *software* LAS-AF, disponível no Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares – LIAREC da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Neste estudo, as peles suínas foram mantidas nas condições anteriormente mencionadas (item 3.2.1.1). No compartimento doador foram aplicados exatamente 200 µL de siRNA Alexa Fluor 647 livre (água livre de RNase), 200 µL de NLC TP-siRNA Alexa Fluor 647 e 0,2 g de hidrogel contendo NLC TP-siRNA Alexa Fluor 647. A concentração final de siRNA Alexa Fluor 647 utilizada foi equivalente a 5 µM.

Após 6 horas, as peles (n = 2) foram removidas da célula vertical de difusão de Franz e as superfícies foram cuidadosamente lavadas com água ultra-filtrada, para remoção do excesso de formulação. Em seguida a região de contato com as formulações foram congeladas em Tissue-Tek® a -20 °C e seccionadas transversalmente a 20 µm em um micrótomo criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha).

Os cortes histológicos foram posteriormente submetidos a coloração dos núcleos, utilizando o marcador DAPI (0,3 µg/mL) por 15 minutos e as lâminas foram armazenadas por 12 h sob refrigeração (4 °C). Após este período, as lâminas foram analisadas em microscópio CLSM. As imagens foram adquiridas com uma objetiva de imersão de 63 × e lasers de $\lambda = 405$ nm e $\lambda = 638$ nm, adequados para DAPI e Alexa Fluor 647, respectivamente. No mínimo seis imagens de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis e representativos.

3.2.6. Estudos *in vitro*

3.2.6.1. Cultivo celular

3.2.6.1.1. Queratinócitos humanos normais imortalizados

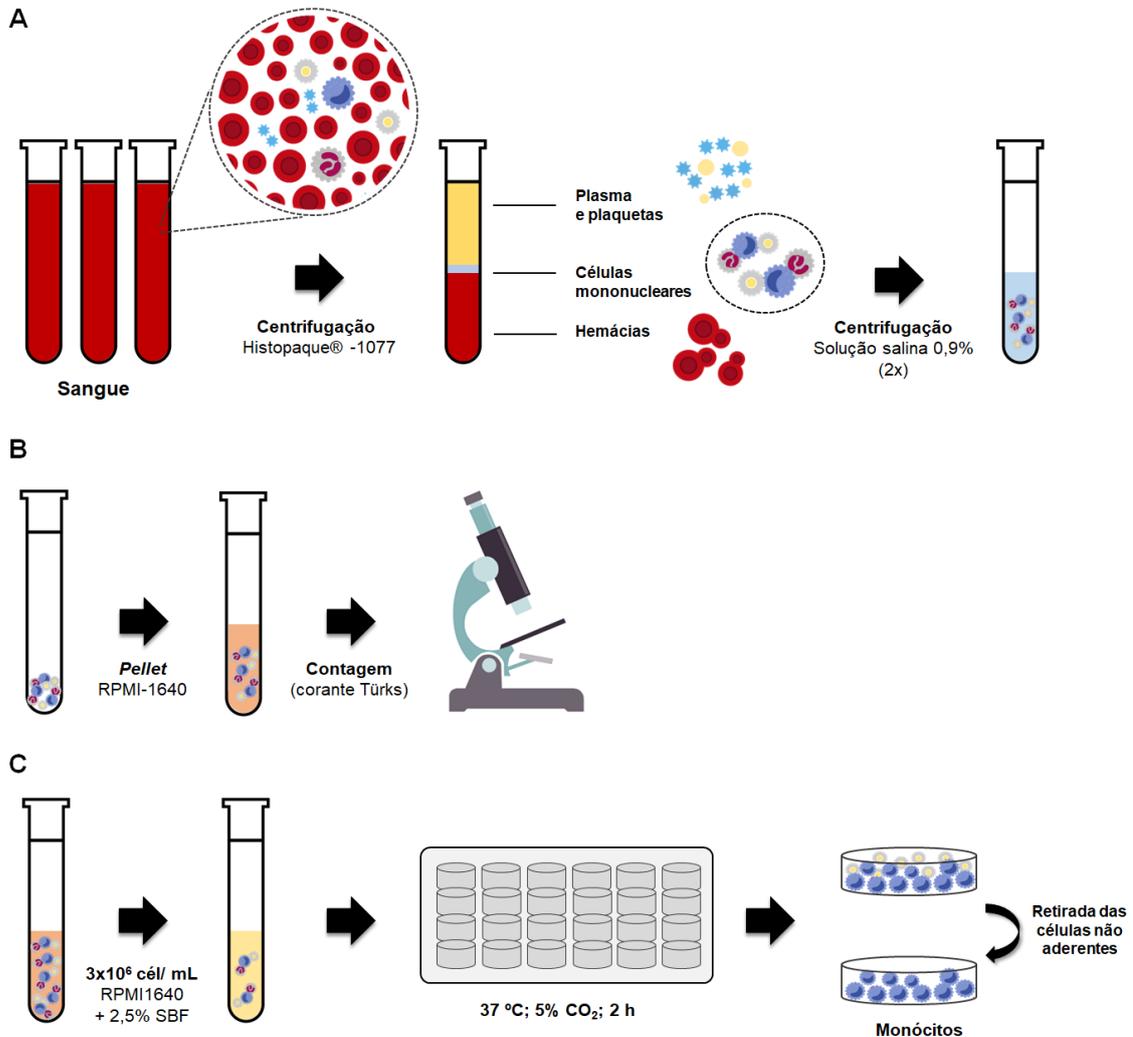
Queratinócitos humanos normais, linhagem HaCaT, foram cultivados em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SBF inativado e 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico (10000 UI de penicilina; 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL). Foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas ao atingir 70 a 80% de confluência, usando tampão fosfato salina (PBS) 1x estéril para lavá-las e tripsina 3% (p/v) para desagregá-las do frasco. Após a desagregação, as células foram centrifugadas a 1600 rpm por 7 min a 25 °C, ressuspensas em meio de cultura, diluídas em azul de Tripán 0,1% e contadas usando câmara de Neubauer.

3.2.6.1.2. Monócitos humanos primários

Para obtenção das células primárias, o sangue venoso (20 mL) foi coletado de três doadores saudáveis do sexo masculino após assinatura do Termo de Consentimento Informado seguindo as normas impostas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 29151420.9.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 527; Parecer Consubstanciado nº 4.062.866).

O sangue foi coletado e acondicionado em frascos a vácuo com heparina. Em seguida, as células mononucleares do sangue periférico humano foram isoladas pelo método do gradiente de densidade, usando Histopaque® 1077, conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, o sangue diluído em solução fisiológica 0,9% (1:1) foi transferido para tubos contendo 3 mL de solução Histopaque® 1077 e centrifugado a 400 x g, por 30 min a 25 °C. Após a centrifugação, a camada das células mononucleares foi cuidadosamente aspirada e transferida assepticamente para tubos de centrifugação estéreis. Após a centrifugação, a suspensão de células foi lavada duas vezes com solução fisiológica 0,9% e cultivada em meio RPMI-1640. Ao final, utilizaram-se alíquotas das células mononucleares isoladas para determinar o número total de células na câmara de Neubauer após coloração celular (1:20, v/v) com solução de Turk (cristal violeta a 0,2% em ácido acético a 30%) (HAMCZYK; VILLA-BELLOSTA; ANDRÉS, 2015; RIOS; TOUYZ; MONTEZANO, 2017) (**Figura 10 A e B**).

Figura 10 - Representação ilustrativa da obtenção e cultivo das células primárias humanas. [A] Coleta e centrifugação do sangue venoso para separação da fração contendo os leucócitos dos demais componentes sanguíneos (plasma, plaquetas e hemácias); **[B]** o pellet de células ressuspenso em meio RPMI-1640 e submetido a contagem em câmara de Neubauer em microscópio; e **[C]** Diluição a 3×10^6 células/mL da suspensão de células em meio RPMI-1640 contendo 2,5% de SBF. Após 2 h as células não-aderidas são retiradas, e as células aderidas são mantidas em cultivo (monócitos).



Fonte: do autor, 2020.

Para obter a cultura de monócitos, a suspensão de células foi diluída a uma densidade de 3×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 contendo 2,5% de SBF, transferidas para placas de 24 poços e incubadas por 2 h a 37 °C e 5% CO₂. Após este período, as células não aderentes são removidas e as células são lavadas com duas vezes com meio RPMI-1640. Em seguida, as células aderidas foram mantidas em meio RPMI-1640 contendo 2,5% de SBF e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ para os futuros ensaios (**Figura 10 C**) (HAMCZYK; VILLA-BELLOSTA; ANDRÉS, 2015; RIOS; TOUYZ; MONTEZANO, 2017).

3.2.6.2. Avaliação da viabilidade celular por resazurina

As células HaCaT foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10^4 células/ poço em 200 μ L de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF, por aproximadamente 15 h a 37 °C e 5% CO₂. Após confirmação da adesão celular, o meio de cultura foi removido e substituído pelo meio contendo as quantidades desejadas de cada amostra (solução de triptolida; siRNA TNF- α livre; NLC sem PAH; NLC TP sem PAH; NLC; NLC TP; NLC com siRNA TNF- α e NLC TP com siRNA TNF- α). Como controle positivo as células foram tratadas com meio de cultura e como controle negativo as células foram tratadas com 30% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO).

Após 24 h de incubação, o meio de cultura contendo cada amostra foi removido, as células então foram lavadas com PBS 1x estéril e o meio foi repostado com resazurina a 25 μ g/mL. As células foram mantidas durante 4 h em estufa a 37 °C e com 5% de CO₂ para tempo de reação da resazurina. As medidas de fluorescência foram conduzidas em leitor de microplacas (BioTeK® Synergy 2, EUA), sob as condições: excitação λ 530/25 nm, emissão λ 590/35 nm; espelho: top 50%, ganho: 35.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle positivo. A determinação dos valores de IC₅₀ (50% da concentração inibitória máxima) foi obtida pelo método estatístico de curva dose-resposta sigmoideal (*software* GraphPad Prism 5.0).

Os dados obtidos representam os valores médios de cinco replicatas (média \pm DP).

3.2.6.3. Avaliação da eficiência de internalização celular das NLCs

3.2.6.3.1. Eficiência de internalização celular por citometria de fluxo

As análises em citometria de fluxo foram realizadas em citômetro BD FACSCanto™ II (BD Bioscience, EUA), do Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Para determinação da internalização celular por citometria de fluxo as células HaCaT foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de 5×10^5 células/ poço em 1 mL de meio de cultura DMEM, por aproximadamente 15 h a 37 °C e 5% CO₂. Após confirmada a adesão celular, o meio de cultura foi removido e substituído pelo meio contendo as quantidades desejadas de NLC ($2,3 \times 10^8$ partículas/ mL)

complexada com siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM), Lipofectamina 2000® com siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM) e siRNA Alexa Fluor 647 livre (40 nM).

Após 1, 2, 6, 12 e 24 h de incubação com os tratamentos, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas. O conteúdo tripsinizado foi centrifugado a 180 ×g por 7 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 500 µL de PBS 1x. O conteúdo ressuspenso foi homogeneizado com 5 µL de iodeto de propídeo (10 mg/ mL) para indicação da viabilidade celular e então submetido a análise por citometria de fluxo com detectores adequados para iodeto de propídeo (exc/emi: 635/617 nm) e AlexaFluor 647 (exc/emi: 652/670 nm). Os dados obtidos representam os valores médios de cinco replicatas (média ± DP).

3.2.6.3.2. *Eficiência de internalização celular por microscopia confocal de varredura a laser*

Para avaliação da internalização celular do siRNA por microscopia confocal de varredura a laser, as células HaCaT foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de 10⁵ células/ poço em 1 mL de meio cultura DMEM e incubadas por aproximadamente 15 h a 37 °C e 5% CO₂ para permitir a aderência celular nas lamínulas circulares adicionadas a cada poço.

Após confirmada a aderência, o meio foi retirado e substituído por um meio contendo as NLCs (2,3×10⁸ partículas/ mL) complexada com o siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM), e a placa foi novamente incubada. A mesma diluição foi realizada para a Lipofectamina 2000® com siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM) e siRNA Alexa Fluor 647 livre (40 nM).

Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 2% (v/v). O excesso de paraformaldeído foi removido com 2 lavagens com PBS 1x, e em seguida, uma solução com DAPI (0,3 µg/ mL) foi aplicada às células por 10 minutos para marcador dos núcleos celulares. Após, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x, e uma solução com Rodamina 123 (1,0 µg/mL) foi aplicada durante 5 minutos como marcador mitocondrial. Finalmente, as lamínulas foram transferidas para uma lâmina de vidro com uma gota de Fluoromount™ e armazenada a 4 °C *overnight*.

As lâminas foram observadas em microscópio CLSM (modelo Leica TCS SP8, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) e as imagens foram adquiridas em

uma objetiva de imersão de 63 ×, usando laser adequados para DAPI ($\lambda = 405 \text{ nm}$), Rodamina 123 ($\lambda = 552 \text{ nm}$) e Alexa Fluor 647 ($\lambda = 638 \text{ nm}$).

No mínimo cinco imagens que foram adquiridas de amostragem aleatória ($n=3$ experimentos independentes) de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis e representativos.

3.2.6.4. Estudo dos papéis das vias endocíticas na internalização celular das nanodispersões líquido-cristalinas

3.2.6.4.1. Viabilidade celular dos inibidores químicos por resazurina

Para determinar a concentração que mantivesse mais de 80% das células HaCaT viáveis realizou-se o ensaio com diferentes concentrações dos inibidores (**Tabela 2**) e a viabilidade celular foi previamente determinada por resazurina (descrição item 3.2.7.2.).

Tabela 2 - Inibidores de endocitose: mecanismos e concentrações avaliadas

Via de captação	Inibidor	Mecanismo de inibição ¹	Faixa de concentração
<i>Clatrina</i>	Sacarose	Remove retículos de clatrina na membrana plasmática	2 a 0,05 M
	Clorpromazina	Perda de clatrina e do complexo adaptor AP2 da membrana plasmática	50 a 0,5 μM
<i>Caveolina</i>	Metil- β -ciclodextrina	Solubilização de domínios ricos em colesterol	20 a 0,1 mM
	Filipina III	Sequestro de colesterol da membrana	30 a 0,5 μM
<i>Macropinocitose</i>	Amilorida	Inibidor de bomba de sódio/próton, interferindo na sinalização de Rac1 e Cdc42	2 a 0,005 mM
	Citocalasina D	Despolimerização actina e desmontagens dos filamentos	7,5 a 0,01 μM
<i>Fagocitose</i>	Citocalasina B	Despolimerização de F-Actina	30 a 0,1 μM
<i>Metabolismo celular</i>	Azida sódica	Inibição da síntese de ATP	175 a 1 mM
<i>Acidificação endossomal</i>	Cloroquina	Inibição da acidificação lisossomal	150 a 0,5 μM

Fonte: do autor, 2020.

¹ (EL-SAYED; HARASHIMA, 2013; ZHAO; STENZEL, 2018; NELEMANS; GUREVICH, 2020).

3.2.6.4.2. Avaliação das vias endocíticas por citometria de fluxo

Para estudar a influência das vias endocíticas durante o processo de captação celular das NLC TP as células HaCaT foram cultivadas em placas de 12 poços a uma

densidade de 5×10^5 células/ poço em 1 mL de meio de cultura DMEM, por aproximadamente 15 h a 37 °C e 5% CO₂.

Após confirmada a adesão celular, o meio de cultura foi removido e substituído pelo meio (DMEM isento de SBF) contendo as concentrações desejadas de cada inibidor (pré-determinadas pelo ensaio de viabilidade celular) e mantidas em incubação durante 1 h (37 °C e 5% CO₂). Em seguida, este meio foi substituído pelo meio contendo as NLC TP ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) complexadas com siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM) e incubou-se por 6 h (37 °C e 5% CO₂).

Decorrido o tempo, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas. O conteúdo tripsinizado foi centrifugado a $180 \times g$ por 7 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de PBS 1x. O ressuspensionado então, foi homogeneizado com 5 µL de iodeto de propídeo (10 mg/mL) para indicação da viabilidade celular, e então submetido a análise por citometria de fluxo com detectores adequados para iodeto de propídeo (exc/emi: 635/617 nm) e AlexaFluor 647 (exc/emi: 652/670 nm). Neste ensaio foram realizados como controles: células vivas cultivadas em meio DMEM isento de SBF e células tratadas apenas com as NLC TP-siRNA Alexa Fluor 647.

Os dados obtidos representam a porcentagem relativa de internalização em comparação com o controle sem pré-tratamento com inibidor (média \pm DP; n = 3).

3.2.6.5. Avaliação do tráfico intracelular por microscopia confocal de varredura a laser

Para avaliação do tráfico intracelular das NLC TP complexadas com siRNA Alexa Fluor 647 por microscopia confocal de varredura a laser, as células HaCaT foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de 10^5 células/ poço em 1 mL de meio cultura DMEM e incubadas por aproximadamente 15 h a 37 °C e 5% CO₂ para permitir a aderência celular nas lamínulas circulares adicionadas a cada poço.

Após confirmada a aderência, o meio foi retirado e substituído pelo meio contendo as NLC TP ($2,3 \times 10^8$ partículas/ mL) complexada com o siRNA Alexa Fluor 647 (40 nM), e a placa foi novamente incubada por 1, 2, 6, 12 e 24 h. A coloração com o LysoTracker Green DND26 (100 nM) foi adicionada às células junto com os tratamentos 1 hora antes de completar o período total estimado para a incubação.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 2% (v/v). O excesso de paraformaldeído foi removido com 3 lavagens com PBS 1x, e em seguida, uma solução com DAPI (0,3 µg/mL) foi aplicada às células por 10 minutos para marcador dos núcleos celulares. Finalmente, as lamínulas foram transferidas para uma lâmina de vidro com uma gota de Fluoromount™ e armazenada a 4 °C overnight.

As lâminas foram observadas em microscópio CLSM (modelo Leica TCS SP8, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) e as imagens foram adquiridas em uma objetiva de imersão de 63 ×, usando laser adequados para DAPI ($\lambda = 405$ nm), LysoTracker Green DND26 ($\lambda = 511$ nm) e Alexa Fluor 647 ($\lambda = 638$ nm). No mínimo cinco imagens foram adquiridas de cada replicata aleatória (n=3 experimentos independentes) e analisadas para garantir resultados reprodutíveis e representativos.

3.2.6.5.1. *Análise quantitativa da co-localização*

A análise quantitativa da co-localização de cada fluoróforo nas imagens sobrepostas é obtida por algoritmos que calculam os coeficientes de correlação, como o coeficiente de Pearson e os coeficientes de Mander (BOLTE; CORDELIÈRES, 2006). Os valores dos coeficientes de Pearson e Mander analisados separadamente podem levar a falsas interpretações, por isso devem ser utilizados em conjunto para investigar se há ou não co-localização (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011).

O coeficiente de Pearson (CP) é referenciado como a porcentagem de sobreposição de pixels. Este teste estatístico indica se há relação linear entre as intensidades dos diferentes canais em cada pixel da imagem e isso pode indicar a co-localização de dois fluoróforos. O CP pode variar de -1 a 1, no qual, "1" indica uma perfeita correlação, "0" indica nenhuma correlação e "-1" indica correlação negativa ou ausente. Os valores positivos são indicativos de co-localização e os valores negativos de nenhuma co-localização. É possível também, classificar em alta, moderada ou baixa correlação, quando o CP está entre 1-0,7, 0,69-0,36 e 0,35-0,2, respectivamente. Valores abaixo de 0,2 indicam nenhuma correlação.

Os coeficientes de Mander (M) são baseados no coeficiente de Pearson, porém os valores médios de intensidade não são empregados nos cálculos. São calculados dois coeficientes: M1, definido como a razão entre a soma das intensidades de todos os pixels no canal 1 e a intensidade total do canal 2; e M2, é a razão entre a soma das intensidades de todos os pixels no canal 2 e a intensidade total do canal 1. Estes

coeficientes podem variar de 0 a 1, e são bons indicadores da proporção do sinal do canal 1 coincidente com o sinal do canal 2.

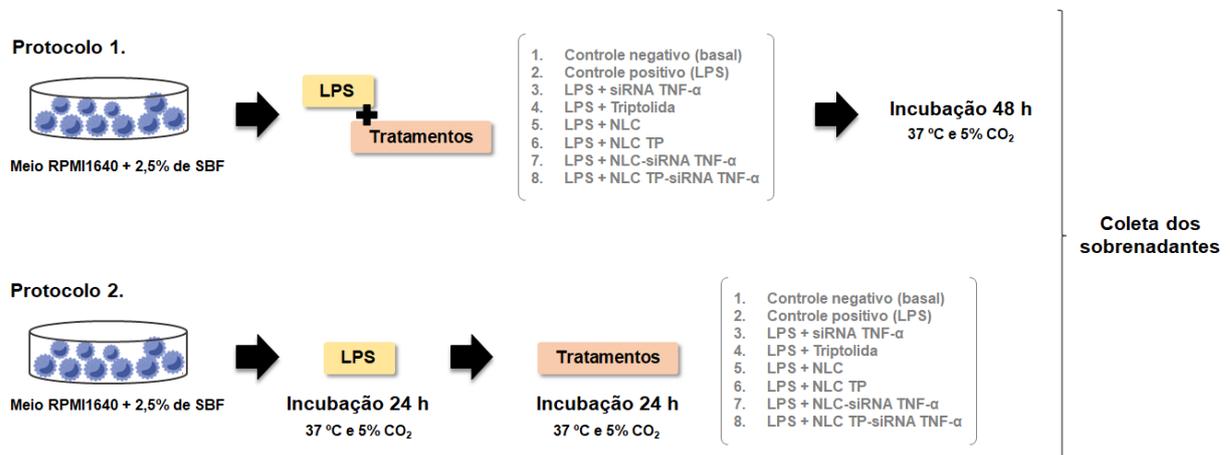
Para este ensaio, cinco imagens de cada réplica ($n = 3$), correspondendo a uma média de 10 células por imagem, foram analisadas em cada tempo, e os coeficientes foram determinados usando o *plugin JACoP* do *software ImageJ*. Os dados são apresentados pela média \pm DP.

3.2.6.6. Avaliação da eficácia terapêutica in vitro

3.2.6.6.1. Desenho experimental e amostragem

As culturas celulares de monócitos obtida de acordo com o protocolo experimental descrito no item 3.2.7.1.2., foram utilizadas para os ensaios de avaliação da eficácia terapêutica das formulações em estudo frente a um precursor pró-inflamatório. Dois protocolos experimentais foram propostos: 1) as células foram incubadas com o precursor pró-inflamatório juntamente com os tratamentos durante 48 h; e 2) as células foram incubadas com o precursor pró-inflamatório durante 24 h, e após adicionou-se os tratamentos por mais 24 h (**Figura 11**).

Figura 11 - Protocolos experimentais para avaliação da eficácia terapêutica em monócitos primários humanos.



Fonte: do autor, 2020.

Para ambos os protocolos, na cultura dos monócitos utilizou-se o lipopolissacarídeo (LPS) a uma concentração final de 1 μ g/mL, e os tratamentos foram: triptolida (0,05 μ M), siRNA TNF- α (150 nM), NLC ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL); NLC TP ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL; TP a 0,05 μ M); NLC ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) com siRNA

TNF- α (150 nM); e NLC TP ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL; TP a 0,05 μ M) com siRNA TNF- α (150 nM). Como controle positivo utilizou-se apenas o LPS a 1 μ g/mL e como controle negativo meio de cultura RPMI-1640.

Após decorrido o tempo total de incubação (48 h), o meio foi retirado e armazenado a -80 °C para determinação das citocinas produzidas/ inibidas.

Análises da viabilidade celular, utilizando o reagente resazurina (descrição item 3.2.7.2.) foram realizadas com as células após a exposição ao LPS e aos tratamentos, de forma a confirmar que as células estavam viáveis durante os procedimentos.

3.2.6.6.2. *Quantificação de citocinas por ELISA*

Para determinação das citocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β , 50 μ L do sobrenadante das células foram submetidos ao ensaio imunoenzimático, de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante (eBioscience, San Diego, CA, USA).

As leituras foram realizadas em leitora de microplaca (BioTeK® Synergy 2, EUA) operando a 450 nm. Os dados obtidos foram expressos em pictogramas (pg) de citocina/ mL e são apresentados pela média \pm DP (n=3/ 3 ensaios independentes).

3.2.6.6.4. *Índice de combinação*

O valor do Índice de Combinação (IC) foi calculado separadamente usando os valores obtidos para as citocinas determinadas por ELISA. O IC foi calculado usando a seguinte equação:

$$IC = \frac{\text{Resultado da combinação}}{\text{Resultado individual}} + \frac{\text{Resultado da combinação}}{\text{Resultado individual}} \quad \text{Equação 8}$$

Os valores de IC foram interpretados da seguinte forma: IC = 0,9-1,1: efeito aditivo, IC = 0,8-0,9: sinergismo leve, IC = 0,6-0,8: sinergismo moderado, IC = 0,4-0,6: sinergismo, IC = 0,2-0,4: sinergismo forte (CHOU, 2006).

3.2.7. **Análises Estatísticas**

Todos os dados adquiridos foram apresentados como média \pm DP. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student (dois grupos) ou ANOVA (vários grupos). O nível de significância adotado foi de 95% de confiança e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRIPTOLIDA POR CLAE

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos são visados para fornecer informações quantitativas precisas, exatas e confiáveis sobre determinado analito em uma amostra. O processo de validação é importante para detectar erros sistemáticos dos procedimentos analíticos e oferecer evidências da confiabilidade do método (ERMER, 2001; ICH, 2005; FDA, 2015). Desta forma, no presente trabalho, o método em CLAE UV-Vis foi desenvolvido e validado para permitir a quantificação de triptolida nos ensaios de caracterização do sistema carreador.

Durante a fase de desenvolvimento do método, a condição cromatográfica que apresentou melhor separação e tempo de retenção, bem como picos mais finos e simétricos, foi quando optou-se por utilizar uma coluna C₁₈ de fase reversa de tamanho de 250 mm x 4,6 mm (granulometria de 5 µm), fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30 v/v) acidificada com 0,02% (v/v) de ácido ortofosfórico (pH 4,5), a uma vazão de 0,9 mL/min e forno da coluna à 25 °C.

A assimetria dos picos também foi avaliada quanto ao volume de injeção da amostra. O volume de injeção de 40 µL foi escolhido, uma vez que não aumentou significativamente a largura dos picos e conferiu maior sensibilidade ao método. O tempo de retenção da triptolida em média de 4,4 min foi considerado adequado, uma vez que foi capaz de identificar o analito de interesse (triptolida) e este não foi eluído no volume morto da coluna.

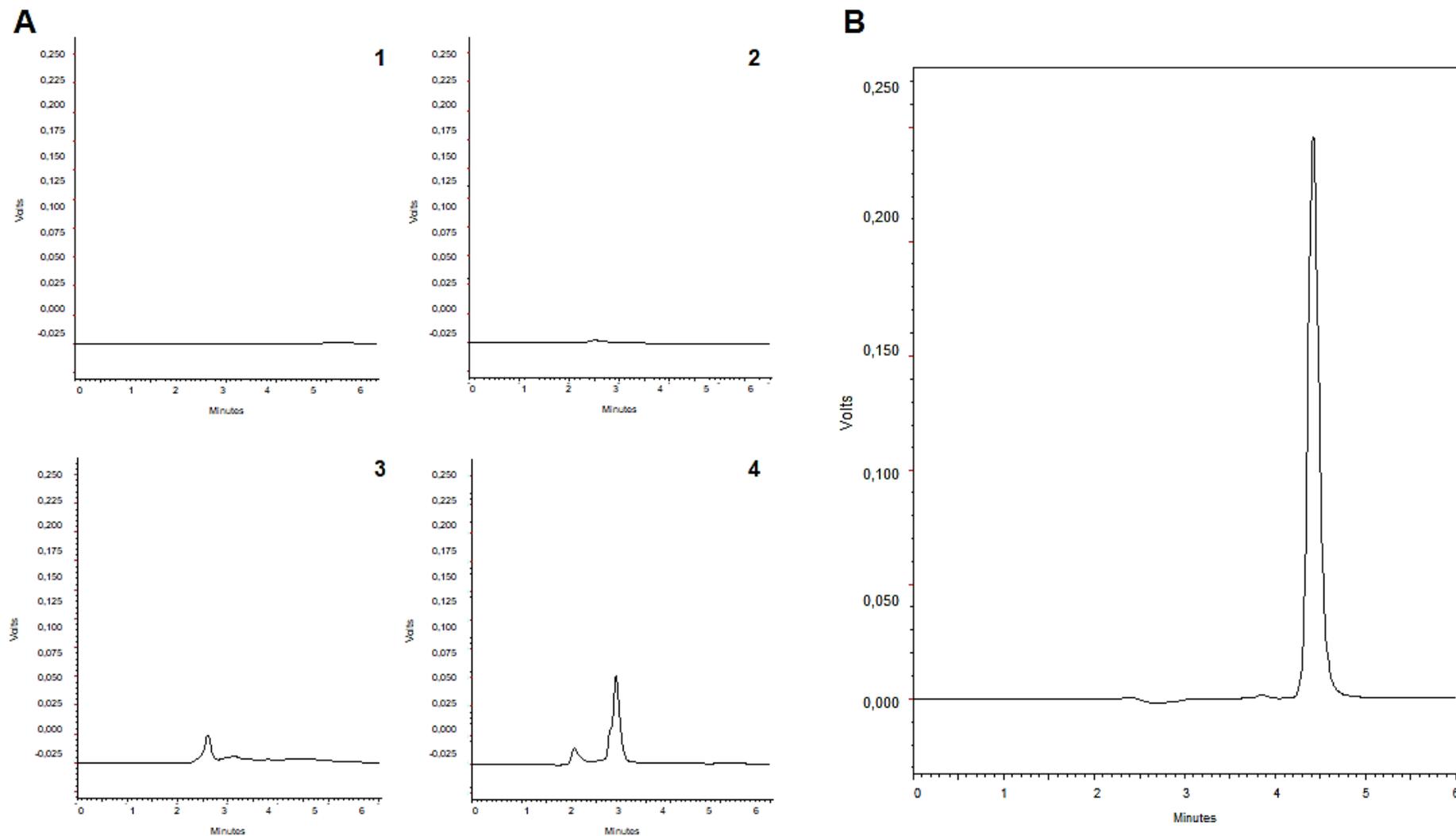
Após determinar a melhor condição analítica, o método foi validado de acordo com as normas nacionais e internacionais, para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra- e inter-dias, determinação do limite de quantificação e limite de detecção, recuperação em matriz biológica e robustez.

4.1.1. Seletividade

A seletividade do método analítico refere-se à capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da

matriz (Art.19, Seção I, RDC nº 166/ 2017, ANVISA). Sendo assim, diferentes meios foram avaliados para verificar a possibilidade de interferentes em análises futuras, como (i) fase móvel; (ii) tampão fosfato de sódio (0,01 M; pH 7,0); (iii) formulação de estudo e (iv) pele homogeneizada em acetonitrila (**Figura 12 A**). De acordo com os cromatogramas obtidos, não foi observado interferências no tempo de retenção referente à triptolida (**Figura 12 B**). Portanto, o método analítico demonstrou-se seletivo nas condições propostas. A resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz ou impurezas.

Figura 12 - Perfil cromatográfico do método analítico em CLAE para determinação de triptolida. [A] Cromatogramas referentes à seletividade do método analítico: **[1]** fase móvel; **[2]** tampão fosfato de sódio (0,01 M; pH 7,0); **[3]** formulação de estudo e **[4]** pele triturada e homogeneizada em acetonitrila. **[B]** Cromatograma representativo da concentração de triptolida a 12,5 µg/ mL.



Fonte: do autor, 2020.

4.1.2. Linearidade

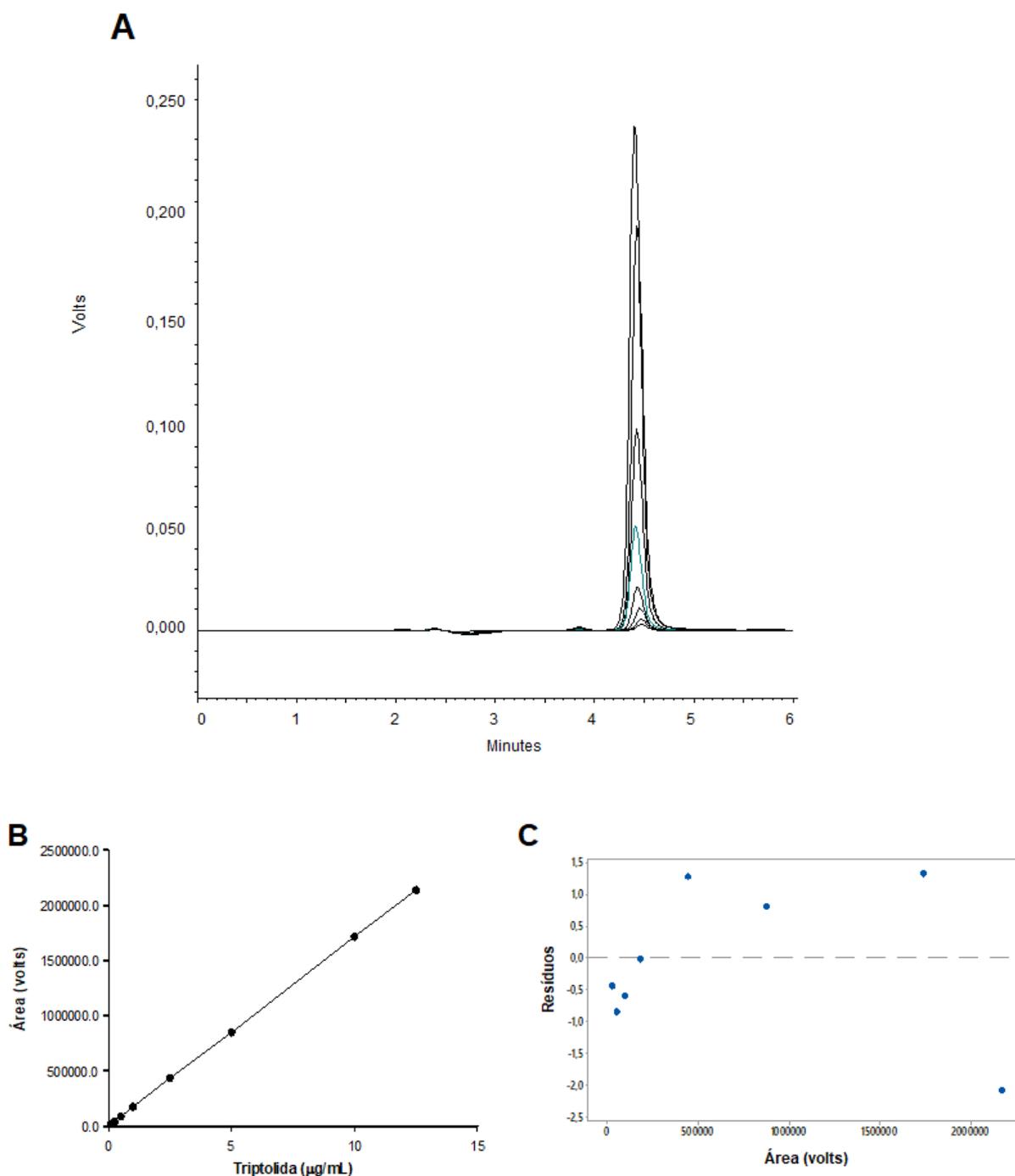
Para determinar a linearidade do método foi utilizada uma curva analítica com soluções de triptolida nas concentrações de 0,1 a 12,5 µg/mL (**Figura 13 A**). O gráfico da regressão linear representado na **Figura 13 B**, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9999 e equação da reta $y = 167898x - 620,56$ confirmou a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra.

A faixa de concentração avaliada neste ensaio foi escolhida de forma a atender os requisitos de quantificação do analito nos ensaios de eficiência de encapsulação e nos ensaios de liberação e permeação *in vitro*, já que, esses ensaios exigem que o método analítico seja capaz de determinar baixas concentrações da triptolida nas amostras.

Análises estatísticas da curva analítica em triplicata pelo teste de Durbin Watson mostraram que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente, de maneira homocedástica (**Figura 13 C**). De acordo com os cálculos realizados, o valor de obtido de D (1, 54011) foi menor que 2,17 (DU), ou seja, confirmando a não correlação dos erros (Savin & White, 1977). Neste teste a autocorrelação dos erros significa que os erros de observações adjacentes são correlacionados, e desta forma a regressão de mínimos quadrados pode subestimar o erro padrão dos coeficientes. Os erros padrão subestimados podem fazer com que seus preditores pareçam significativos quando eles não são.

O teste de ajuste (*lack-of-fit*), seguido do teste de Anderson-Darling também foram realizados para confirmar a aleatoriedade dos dados. No teste de ajuste, para determinar corretamente a hipótese nula, o valor de p obtido é comparado ao seu nível de significância ($\alpha = 0,05$). Desta forma, a análise mostrou-se estatisticamente significativa por apresentar $p = 0,047$. O teste Anderson-Darling (normalidade dos resíduos) complementou os dados obtidos no teste de Durbin-Watson, confirmando a distribuição aleatória dos dados em uma análise particular.

Figura 13 - Perfil cromatográfico e análise estatística da linearidade do método analítico. [A] Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a curva analítica em concentrações de 0,1 a 12,5 µg/mL. **[B]** Representação gráfica da regressão linear obtida para a curva analítica (equação da reta $y = 167898x - 620,56$ e $R^2 = 0,9999$). **[C]** Perfil de distribuição residual de triptolida obtida pelo teste de Durbin Watson.



Fonte: do autor, 2020.

4.1.3. Precisão e exatidão

A **Tabela 3** mostra os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intra- e inter-dias.

Tabela 3 - Análise da precisão e da exatidão intra- e inter-dia.

Parâmetros	Triptolida		
	<i>Intra-dia</i>		
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	10	2,5	0,5
Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$)	9,98 \pm 0,04	2,51 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01
N	3	3	3
Precisão (CV, %)	0,446	0,224	0,236
Exatidão (Rec, %)	99,67 \pm 0,44	100,40 \pm 0,22	103,32 \pm 0,24
	<i>Inter-dia</i>		
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	10	2,5	0,5
Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$)	10,01 \pm 0,03	2,54 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01
N	9	9	9
Precisão (CV, %)	0,302	0,504	0,337
Exatidão (Rec, %)	100,08 \pm 0,31	101,45 \pm 0,55	99,47 \pm 0,34

Abreviação: N = correspondente ao número de determinações.

Fonte: do autor, 2020.

Os resultados obtidos têm como finalidade fornecer informações sobre a confiabilidade das medições durante toda a faixa especificada de trabalho. Neste sentido, a exatidão reflete o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (Art. 42, Seção VI, RDC n° 166/ 2017, ANVISA). Enquanto que a precisão avalia a concordância ou proximidade entre as medidas de replicatas, sendo expressa pela repetibilidade (variação intra-ensaio), precisão intermediária ou pela reprodutibilidade (variação inter-ensaio) (Art. 33, Seção V, RDC n° 166/ 2017, ANVISA).

De acordo com as especificações e atribuições necessárias, o método em estudo apresentou coeficiente de variação abaixo de 0,5% para os estudos intra- e inter-dias, nos três níveis de concentração de triptolida. O método também se mostrou exato, com uma porcentagem de recuperação média de 100%. De acordo com as normas da RDC n° 166/ 2017 da ANVISA, em termos numéricos, o coeficiente de variação e a porcentagem do erro relativo (para exatidão) não devem ser superiores

a 10% para validar a confiabilidade do método. Portanto, os valores obtidos nestes ensaios estão de acordo e garantem a confiabilidade do método.

4.1.4. Limite de quantificação e limite de detecção

O valor do LQ foi determinado na concentração de triptolida a 0,05 µg/mL com coeficiente de variação de 1,66% e exatidão de $109,3 \pm 1,8\%$. Este resultado refere-se a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Art. 55, Seção VIII, RDC nº 166/ 2017, ANVISA).

O limite inferior de detecção determinado pela razão ruído ($\geq 2:1$), foi obtido com a concentração de triptolida referente à 0,025 µg/mL.

4.1.5. Teste de recuperação em matriz

A **Tabela 4** mostra os valores obtidos no ensaio de recuperação da triptolida em matriz biológica após processo de extração.

Tabela 4 - Representação dos dados para o teste de recuperação.

<i>Parâmetros</i>	<i>Triptolida</i>		
<i>Concentração teórica (µg/mL)</i>	10	2,5	0,5
<i>Concentração mensurada (µg/mL)</i>	$9,58 \pm 0,23$	$2,38 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,01$
<i>N</i>	3	3	3
<i>Recuperação (Rec, %)</i>	$95,98 \pm 2,27$	$95,52 \pm 4,23$	$100,35 \pm 3,48$

Abreviação: N = correspondente ao número de determinações.

Fonte: do autor, 2020.

Os resultados obtidos mostram que o método de extração da triptolida adicionada na matriz biológica foi eficiente, com mais de 95% da triptolida recuperada e quantificada, assegurando a exatidão e a confiabilidade da metodologia empregada para futuros ensaios nesta matriz biológica.

4.1.6. Robustez

A **Tabela 5** mostra os dados obtidos para o ensaio de robustez.

Tabela 5 - Representação dos dados para a análise de robustez.

Parâmetros	Triptolida 10 µg/mL		Triptolida 2,5 µg/mL		Triptolida 0,5 µg/mL	
	tR (min)	Amplitude (volts)	tR (min)	Amplitude (volts)	tR (min)	Amplitude (volts)
Padrão	4,389 ± 0,002	0,1975 ± 0,0001	4,407 ± 0,012 *	0,0509 ± 0,0002	4,463 ± 0,004	0,0103 ± 0,0002
λ 217 nm	4,545 ± 0,002 *	0,1945 ± 0,0003	4,561 ± 0,002 *	0,0525 ± 0,0003	4,595 ± 0,004	0,0103 ± 0,0002 *
λ 219 nm	4,584 ± 0,004 *	0,2022 ± 0,0013	4,598 ± 0,003 *	0,0519 ± 0,0003	4,603 ± 0,0007	0,0105 ± 0,0003 *
65:35 (v/v)	4,957 ± 0,001 *	0,1928 ± 0,0030	4,960 ± 0,0007 *	0,0466 ± 0,0002	4,972 ± 0,002	0,0091 ± 0,0001 *
75:25 (v/v)	4,379 ± 0,001 *	0,2030 ± 0,0008	4,390 ± 0,002	0,0537 ± 0,0006	4,400 ± 0,001	0,0110 ± 0,0003 *
0,85 mL/min	4,738 ± 0,007 *	0,1989 ± 0,0038	4,770 ± 0,039 *	0,0514 ± 0,0008	4,781 ± 0,001	0,0101 ± 0,0001 *
0,95 mL/min	4,454 ± 0,002 *	0,1993 ± 0,0002	4,463 ± 0,002 *	0,04955 ± 0,0006	4,474 ± 0,001	0,0104 ± 0,0002 *

Abreviação: tR = tempo de retenção.

Estatística dos dados realizada por One Way-ANOVA, pós teste de Tukey (* $p < 0,0001$).

Fonte: do autor, 2020.

Este estudo foi realizado com o intuito de verificar a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas (Art. 61, Seção IX, RDC nº 166/ 2017, ANVISA). Os dados obtidos indicam quando as medições são suscetíveis a variações e estas devem ser adequadamente controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento, de modo que a validade do procedimento é mantida sempre que utilizado (ICH, 2005).

Os parâmetros estabelecidos para avaliar a robustez do método em estudo foram selecionados de acordo com as recomendações da ICH (2005), como a vazão e proporções da fase móvel. O comprimento de onda foi selecionado para verificar a sua influência no método, visto que, na literatura os métodos analíticos em CLAE-UV Vis utilizam diferentes comprimentos de onda (CHANG *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008a; LI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). O tempo de retenção e a amplitude do pico da triptolida foram os parâmetros analisados como resposta, uma vez que, refletem as mudanças na sensibilidade do método e na quantificação precisa e exata da triptolida.

De acordo com os resultados (**Tabela 5**), as variações na proporção e vazão da fase móvel foram os parâmetros que mais afetaram a corrida cromatográfica em relação ao tempo de retenção da triptolida. A fase móvel com menor proporção de

acetonitrila (65%) prolongou o tempo de retenção em média de 0,5 min ($p < 0,0001$), o que está relacionado com a mudança da força de eluição da fase móvel, influenciando na capacidade com que o eluente desloca o analito pela fase estacionária. De forma semelhante, a redução da vazão da fase móvel prolongou o tempo de retenção em média de 0,4 min ($p < 0,0001$), o que já era de esperado, devido a redução da velocidade de deslocamento do analito pela da matriz estacionária da coluna analítica (SYNDER *et al.*, 1997).

Em relação às respostas obtidas para a amplitude dos picos, não foi observado valores estatisticamente diferentes (One way-ANOVA, pós teste de Tukey), indicando que os parâmetros alterados não influenciaram na sensibilidade do método.

4.2. NANODISPERSÃO LÍQUIDO-CRISTALINA COMO SISTEMA CARREADOR MULTIFUNCIONAL

4.2.1. Desenvolvimento das NLCs

As NLCs propostas neste trabalho como sistema carreador de triptolida e siRNA TNF- α foram desenvolvidas com base na metodologia previamente descrita pelo grupo de pesquisa (LOPES *et al.*, 2006; ROSSETTI *et al.*, 2011). Essas nanoestruturas têm se mostrado, nos últimos anos, uma excelente plataforma para administração de fármacos e agentes de imagem (ZHAI *et al.*, 2019; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

A produção de sistemas líquido-cristalinos requer que todas as etapas sejam cuidadosamente selecionadas e executadas para que o produto final retenha a estrutura líquido-cristalina e também apresente um tamanho apropriado e baixo índice de polidispersão (MILAK; ZIMMER, 2015). Além disso, é sabido que a incorporação de aditivos pode influenciar a curvatura interfacial da bicamada lipídica, e desta forma, alterar o tipo de mesofase líquido-cristalina (HUANG; GUI, 2018). À vista disso, a incorporação de diferentes concentrações do polímero catiônico, PAH, foi avaliada quanto à sua capacidade de fornecer carga positiva às partículas sem alterar a estrutura hexagonal do sistema a granel, que foi previamente avaliado por microscopia de luz polarizada. Este polímero foi escolhido para permitir a interação eletrostática entre as NLCs e as moléculas de siRNA, e assim, possibilitar a veiculação dessas moléculas através da pele e posterior internalização celular.

Para definir a concentração ideal de PAH no sistema, o diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta das NLCs foram analisados, e estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Avaliação das diferentes concentrações de PAH.

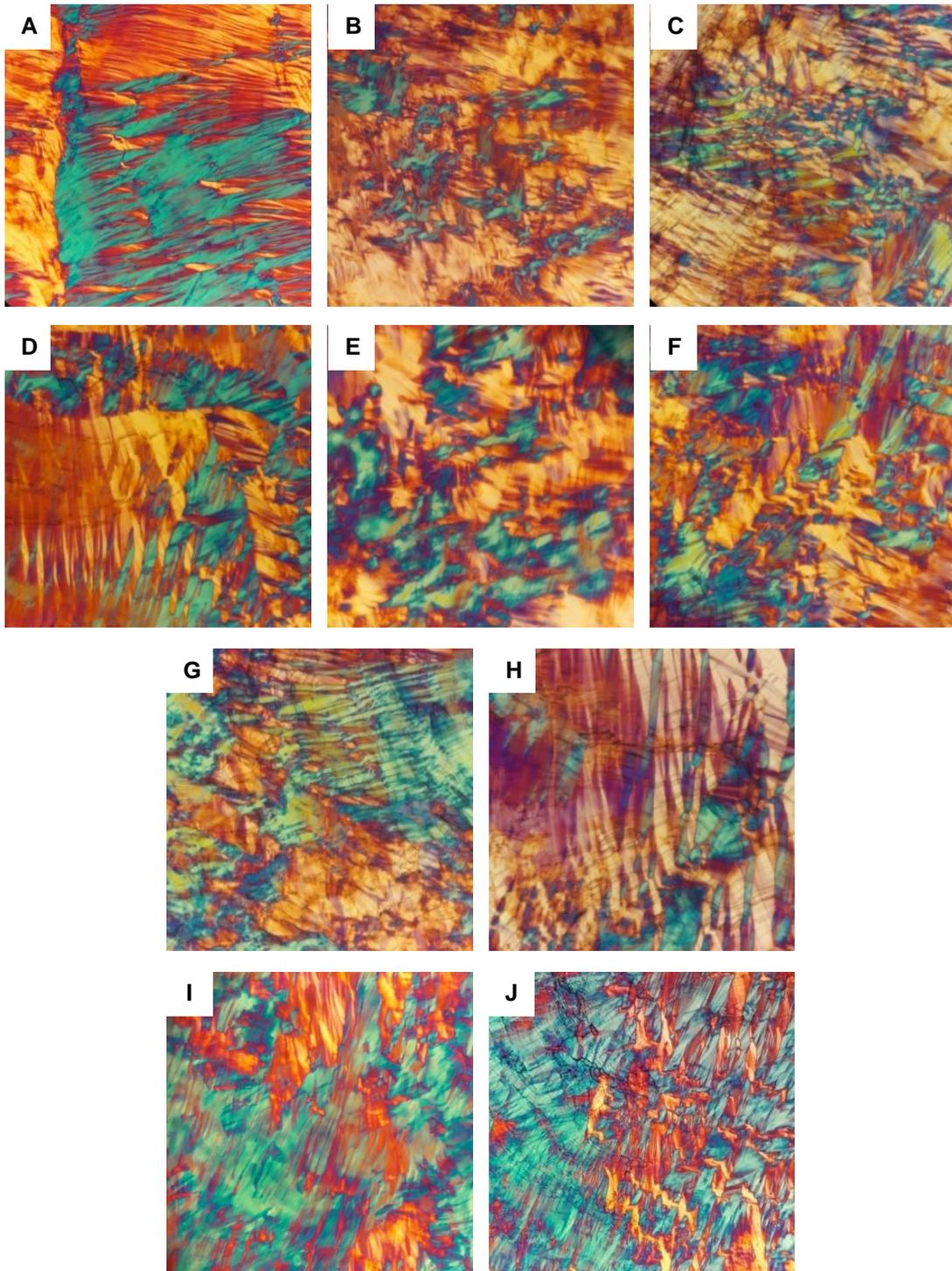
<i>PAH (% m/m)</i>	<i>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
0	160,5 ± 0,8	0,15 ± 0,07	-40,8 ± 0,3
0,1	163,2 ± 0,5	0,16 ± 0,08	-15,6 ± 0,6
0,25	158,9 ± 1,8	0,25 ± 0,02	+2,8 ± 0,3
0,5	150,3 ± 1,3	0,12 ± 0,05	+10,2 ± 0,1
0,75	156,8 ± 1,2	0,18 ± 0,09	+11,6 ± 0,5
1	236,1 ± 0,6	0,23 ± 0,08	+12,2 ± 0,4
1,5	239,5 ± 0,8	0,35 ± 0,06	+11,5 ± 0,7
2	245,6 ± 0,5	0,42 ± 0,08	+11,8 ± 0,9

Abreviações: PAH = poli(alilamina hidroclorada); PDI = *polydispersity index*.
Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados obtidos, a concentração de 0,5% (m/m) de PAH forneceu carga superficial positiva às partículas, e não resultou em aumento do diâmetro hidrodinâmico ou o PDI da dispersão. Concentrações mais altas de PAH influenciaram negativamente sobre o PDI e não proporcionaram maiores valores de potenciais zeta. Portanto, esta concentração foi escolhida para a realização dos futuros ensaios.

No sistema a granel, foi observado que as concentrações de PAH não alteraram o padrão de birrefringência observado em luz polarizada para a mesofase hexagonal (**Figura 14 A-H**). Por esta técnica, também observamos a influência da incorporação da triptolida (**Figura 14 I-J**), a qual não alterou o perfil de birrefringência, caracterizado por textura semelhante a um leque (MILAK; ZIMMER, 2015; AKBAR *et al.*, 2017). Esta característica está relacionada com a natureza anisotrópica da mesofase hexagonal, assim, por desviarem do plano da luz polarizada, ocorre a formação de imagens e texturas (MANAIA *et al.*, 2017; SILVESTRINI *et al.*, 2020).

Figura 14 - Fotomicroscopias representativas obtidas por microscopia de luz polarizada dos sistemas líquido-cristalino após 24 h de equilíbrio. [A] Sistema líquido cristalino sem PAH; **[B-H]** sistema líquido-cristalino com diferentes concentrações de PAH (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0/ 1,5; e 2,0 %, respectivamente). **[I]** Sistema líquido-cristalino com 0,04% de triptolida. **[J]** Sistema líquido-cristalino com 0,5% de PAH e 0,04% de triptolida. Objetiva de 32x, temperatura 25°C.



Fonte: do autor, 2020.

4.2.2. Caracterização físico-química das NLCs

Uma abordagem racional para o *design* e produção de nanopartículas como plataforma para liberação de medicamentos abrange uma série de investigações físico-químicas e biológicas. Características como forma, tamanho, composição e propriedades da superfície modulam o desempenho biológico dos nanotransportadores e, portanto, é importante aplicar técnicas analíticas que permitam a caracterização biofísica de precisão e o mapeamento dos parâmetros de “estrutura-atividade”, além de garantir a qualidade e a segurança (MANAIA *et al.*, 2017; RAWAL; SINGH; AMIJI, 2019).

4.2.2.1. Parâmetros de caracterização físico-química

As NLCs desenvolvidas foram caracterizadas quanto as suas propriedades físico-químicas e os dados obtidos para diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, PDI, potencial zeta, número de partículas/mL e a eficiência de encapsulação da triptolida estão detalhados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Dados físico-químicos de caracterização das NLCs.

<i>Formulação</i>	<i>Tamanho hidrodinâmico (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>	<i>Partículas/mL</i>	<i>EE (%)</i>
<i>NLC sem PAH</i>	159,7 ± 1,1	0,13 ± 0,01	-42,9 ± 0,7	5,7 x 10 ¹²	n.a.
<i>NLC TP sem PAH</i>	145,8 ± 0,5	0,18 ± 0,01	-46,8 ± 1,5	5,4 x 10 ¹²	89,5 ± 3,8
<i>NLC</i>	151,5 ± 1,1	0,13 ± 0,01	+11,2 ± 0,1	4,1 x 10 ¹²	n.a.
<i>NLC TP</i>	148,3 ± 0,1	0,15 ± 0,01	+11,3 ± 0,6	4,2 x 10 ¹²	90,3 ± 2,5
<i>NLC-siRNA</i>	155,8 ± 0,9	0,16 ± 0,01	+4,61 ± 0,5	n.a.	n.a.
<i>NLC TP-siRNA</i>	152,8 ± 1,4	0,20 ± 0,01	+5,80 ± 0,8	n.a.	n.a.
<i>NLC hidrogel</i>	156,8 ± 1,8	0,20 ± 0,04	+9,01 ± 0,8	n.a.	n.a.
<i>NLC TP hidrogel</i>	155,3 ± 0,8	0,19 ± 0,02	+10,4 ± 0,5	n.a.	n.a.
<i>NLC-siRNA hidrogel</i>	159,8 ± 0,8	0,18 ± 0,03	+3,01 ± 0,9	n.a.	n.a.
<i>NLC TP-siRNA hidrogel</i>	158,6 ± 0,6	0,20 ± 0,02	+4,26 ± 0,5	n.a.	n.a.

Dados apresentados pela média ± DP (n = 3).

Abreviações: PDI = *polydispersity index*; EE = eficiência de encapsulação da triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina; PAH = poli(alilamina hidroclorada); TP = triptolida; siRNA = *small interfering RNA*; n.a. = não se aplica.

Fonte: do autor, 2020.

As NLCs produzidas com a incorporação do polímero PAH, bem como da triptolida (NLC TP), apresentaram curvas de distribuição de tamanho simétrico unimodal com diâmetros médios hidrodinâmicos de 145 a 159 nm, e PDIs calculados abaixo de 0,2. O número de partículas por mililitros foi próximo entre as dispersões na presença ou não de triptolida ou PAH (4 a 5×10^{12} partículas/ mL), não apresentando diferenças estatísticas (teste *t* de Student, $p < 0,05$). Podemos observar também que a presença do PAH não influenciou significativamente no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, no PDI ou na eficiência de encapsulação da triptolida (teste *t* de Student, $p < 0,5$).

Partículas com diâmetro hidrodinâmico médio semelhantes também foram reportadas em estudos anteriores. Lopes *et al.* (2006) e Rossetti *et al.* (2011; 2016) obtiveram NLCs hexagonais carregadas com ciclosporina A e diferentes tipos de fotossensibilizadores com diâmetros de partículas variando entre 160 a 180 nm e 130 a 150 nm, respectivamente (LOPES *et al.*, 2006; ROSSETTI *et al.*, 2011, 2016). Outros autores também reportaram que a incorporação de oleo-olanolamida, ácido lipóico e paenol não influenciaram no diâmetro médio das partículas e na distribuição de tamanhos (PDI), enquanto que, a presença de vitamina K, bupivacaina, tacrolimus e pirfenidona resultou em partículas maiores de 200 nm (LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; LI *et al.*, 2015; YOUNUS *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; PRAJAPATI; LARSEN; YAGHMUR, 2019; CAMPOS *et al.*, 2020).

Além disso, esses mesmos autores mostraram que as NLCs possuem alta eficiência de encapsulação, com taxas acima de 80% para resveratrol, rosuvastatina, ácido lipóico e progesterona (MOHYELDIN; MEHANNA; ELGINDY, 2016; GABR; MORTADA; SALLAM, 2017; BADIE; ABBAS, 2018; CAMPOS *et al.*, 2020). De forma semelhante, foi obtido uma taxa de encapsulação de triptolida nas NLC TP acima de 90% (**Tabela 7**). A triptolida, por possuir caráter hidrofóbico, apresenta melhores taxas de aprisionamento em sistemas lipídicos ou híbridos (CHEN; LIU; GAO, 2010; WU *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2019), e corroborando com a literatura, as NLCs, por se tratarem de LLC apresentam domínios hidrofílicos e hidrofóbicos por toda a extensão da mesofase, contribuindo para a eficiente encapsulação da triptolida. Posteriormente, esses dados foram confirmados pelas análises de SAXS (item 4.2.2.3.).

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar também, que a incorporação do PAH, além de fornecer carga superficial positiva às NLCs auxiliou na

formação da nanoestrutura e na sua posterior interação com o siRNA. De forma semelhante, Tran *et al.* (2018) e Astolfi *et al.* (2017) mostraram que o lipídeo 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) utilizado em NLCs cúbicas não alterou significativamente o tamanho de partícula e a polidispersividade (ASTOLFI *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2018), enquanto que, outros agentes catiônicos, como polietilenoimina (PEI), poli- ϵ -lisina e oleilamina promoveram alterações nesses parâmetros (VICENTINI *et al.*, 2013a; DEPIERI *et al.*, 2016; PETRILLI *et al.*, 2016; DESHPANDE; SINGH, 2017).

O potencial zeta das NLC/ NLC TP após a complexação com as moléculas de siRNA a 5 μ M também foi verificado. Observou-se uma redução significativa de, aproximadamente, 6 mV (teste *t* de Student, $p < 0,05$), sugerindo que os grupamentos amina disponíveis do PAH interagiram com os grupamentos fosfato das moléculas de siRNA (**Tabela 7**). Esta condição é vantajosa, pois a interação de altas quantidades de siRNAs em nanocarreadores (mostrando elevados valores de potencial zeta negativo do complexo) resulta em uma atividade silenciadora reduzida devido a redução da atividade fusogênica, e conseqüentemente menor escape endossomal (SATO *et al.*, 2018). Este dado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, discutido no item 4.2.2.2.

Em uma etapa subsequente, foi proposto aumentar a viscosidade das dispersões de NLCs mediante incorporação de HEC. A baixa viscosidade apresentada por essas formulações pode influenciar significativamente na aplicabilidade e no tempo de contato com a pele. Desta forma, a combinação das propriedades químicas e reológicas dos hidrogéis com os recursos exclusivos das nanopartículas, definem uma boa estratégia para desenvolver sistemas de administração de medicamentos destinados ao tratamento de doenças da pele (SOSNIK; SEREMETA, 2017; DESFRANÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018).

Os hidrogéis obtidos com as NLCs apresentaram-se homogêneos. A presença das dispersões resultou em hidrogéis com coloração leitosa. Posteriormente, as medidas de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta mostraram que a presença da HEC não promoveu alterações nesses parâmetros (teste *t* de Student, $p < 0,05$) (**Tabela 7**).

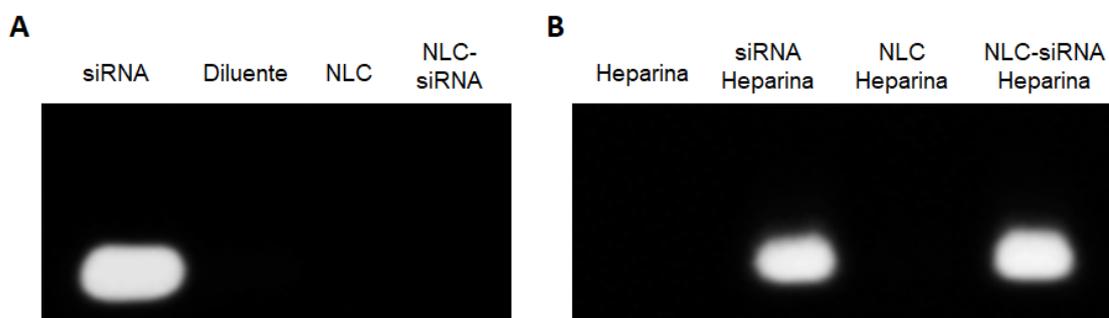
A HEC foi escolhida por formar um gel não-iônico sem a necessidade de aquecimento ou alterações de pH, o que é essencial para não desestabilizar as nanopartículas incorporadas (DESFRAÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018). Na

literatura, NLCs aniônicas carregadas com fotossensibilizadores e posteriormente incorporadas em hidrogel de HEC mantiveram seus parâmetros físico-químicos (ROSSETTI *et al.*, 2011).

4.2.2.2. Análise da eficiência de complexação NLC-siRNA e integridade do siRNA liberado

A capacidade de complexação das NLCs com as moléculas de siRNA foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose. A **Figura 15 A** mostra as fotomicroscopias representativas para este ensaio. A formulação sem siRNA também foi avaliada de modo a verificar se os componentes da mesma não apresentavam banda visível sob luz UV e que pudesse interferir nos resultados.

Figura 15 - Perfil eletroforético representativo do siRNA em gel de agarose. [A] Avaliação da eficiência de complexação das NLCs. **[B]** Avaliação da liberação e integridade do siRNA liberado das NLCs após competição com heparina. Controle positivo: siRNA 5 μ M. Controles negativos: diluente (água isenta de RNase), NLC, heparina, heparina com siRNA 5 μ M e heparina com NLC. Visualização em luz UV e aquisição de imagens pelo *software* QualityOne.



Fonte: do autor, 2020.

Como pode ser observado na **Figura 15 A**, o siRNA livre migra facilmente pelo gel, devido ao seu pequeno tamanho e carga negativa, sendo visualizado na parte inferior do gel. Quando veiculado a carreadores (poliplexos, lipoplexos ou nanopartículas) não é possível observar bandas no gel (SCHOLZ; WAGNER, 2012; REAM; LEWIS; LEWIS, 2016; MALCOLM *et al.*, 2018). Desta forma, a ausência de banda correspondente ao poço em que foi aplicado as NLCs-siRNA infere que houve eficiente interação eletrostática entre os grupos amino do PAH com os grupamentos fosfato do siRNA. Além disso, nenhum resquício foi observado na corrida eletroforética, indicando que não havia moléculas de siRNA em excesso e que a

concentração utilizada não saturou o sistema, o que também foi observado pelas medidas de potencial zeta (**Tabela 7**).

A veiculação do siRNA em vetores, como nanopartículas, é uma estratégia para superar os desafios da entrega cutânea, bem como, proteger do ataque de nucleases, facilitar a sua internalização celular e escape endossomal, para que seja alcançado um silenciamento gênico eficiente. No entanto, no interior citoplasmático da célula alvo, o siRNA deve ser liberado de forma íntegra (DONG; SIEGWART; ANDERSON, 2019; CAILLAUD; EL MADANI; MASSAAD-MASSADE, 2020), e de forma a investigar a integridade e estabilidade do siRNA liberado das NLCs, foi realizado o ensaio de competição com heparina, um potente poliânion (SCHOLZ; WAGNER, 2012; KRIEG *et al.*, 2015).

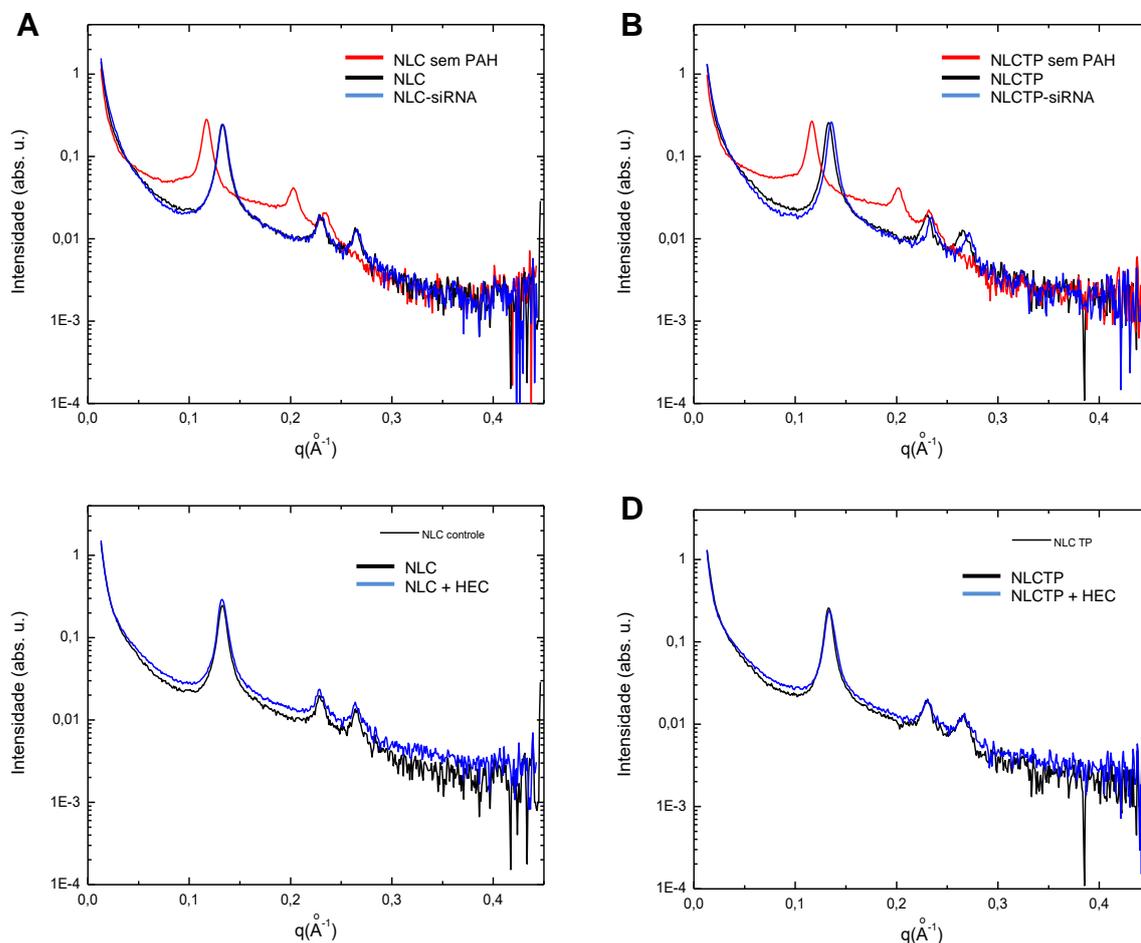
Como observado na **Figura 15 B** a incubação da heparina junto ao complexo NLCs-siRNA resultou em liberação do siRNA. A ausência de fragmentos durante a corrida também sugere que não houve degradação durante a competição e deslocamento do siRNA da nanopartícula (SCHOLZ; WAGNER, 2012).

Para o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que o PAH é utilizado como um agente catiônico em NLCs para permitir a interação eletrostática com siRNA. Na literatura, resultados satisfatórios foram relatados com o uso desse polímero para veiculação de ácidos nucleicos em outras nanopartículas (QIN *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015b; ZHAO; HUANG; JIN, 2015; ANDREOZZI *et al.*, 2017; SONG; TANG; YIN, 2018). Além disso, esse polímero apresentou melhor perfil de citocompatibilidade quando comparado a outros agentes catiônicos (policloreto de dialil dimetil amônio e PEI), bem como, auxiliou eficientemente na captação celular e controlar a liberação de fármacos de modo pH-dependente (HAN, L.; TANG; YIN, 2015; MA *et al.*, 2016; WANG, B. *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016; ZHANG, C. *et al.*, 2017).

4.2.2.3. Análise por SAXS

Análises de SAXS foram realizadas para caracterização da estrutura líquido-cristalina interna das NLCs e a influência dos componentes incorporados na mesofase. A **Figura 16 (A-D)** mostra os perfis de espalhamento obtidos por SAXS para cada amostra, representados pelos gráficos de intensidade *versus* vetor de espalhamento (q).

Figura 16 - Sobreposição dos perfis de espalhamento obtidos por SAXS das NLCs. [A] NLC sem PAH, com PAH e com siRNA 5 μM . **[B]** NLC TP sem PAH, com PAH e com siRNA 5 μM . **[C]** NLC e NLC em hidrogel de HEC 1%. **[D]** NLC TP e NLC TP em hidrogel de HEC 1%.



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os perfis de espalhamento obtidos, todas as NLCs apresentaram um padrão de espalhamento com picos na proporção $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$, correspondendo ao grupo de simetria hexagonal $p6mm$ 2D, conforme especificações na literatura específica sobre LLC (HYDE, 2001; BOYD *et al.*, 2007). Nas Figuras 16 A-B, podemos observar que a presença do polímero PAH provocou o deslocamento para regiões de maiores e repetidos valores de q , o que está relacionada com a diminuição das distâncias interplanares entre as micelas. Enquanto que a presença dos outros componentes não alterou este parâmetro nos perfis de espalhamento

(Figura 16 C-D). Em seguida, foi determinado os valores do parâmetro de rede (denominado α), conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados obtidos por análise de SAXS.

Formulação	q (\AA^{-1})	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede (nm)	
				α	α_H
NLC sem PAH	0,12	5,40	1:1	6,23	6,20 ± 0,04
	0,20	3,10	1: $\sqrt{3}$	6,20	
	0,24	2,66	1: $\sqrt{4}$	6,14	
NLC TP sem PAH	0,12	5,40	1:1	6,23	6,23 ± 0,03
	0,20	3,11	1: $\sqrt{3}$	6,22	
	0,23	2,72	1: $\sqrt{4}$	6,27	
NLC	0,13	4,76	1:1	5,50	5,50 ± 0,02 *
	0,23	2,76	1: $\sqrt{3}$	5,53	
	0,26	2,38	1: $\sqrt{4}$	5,50	
NLC TP	0,13	4,76	1:1	5,50	5,49 ± 0,01 #
	0,23	2,74	1: $\sqrt{3}$	5,49	
	0,26	2,37	1: $\sqrt{4}$	5,48	
NLC-siRNA	0,13	4,70	1:1	5,43	5,46 ± 0,04
	0,23	2,75	1: $\sqrt{3}$	5,51	
	0,27	2,37	1: $\sqrt{4}$	5,46	
NLC TP-siRNA	0,14	4,65	1:1	5,37	5,36 ± 0,01 &
	0,23	2,68	1: $\sqrt{3}$	5,36	
	0,27	2,32	1: $\sqrt{4}$	5,35	
NLC-hidrogel	0,13	4,76	1:1	5,50	5,50 ± 0,01
	0,23	2,75	1: $\sqrt{3}$	5,51	
	0,26	2,38	1: $\sqrt{4}$	5,50	
NLC TP-hidrogel	0,13	4,70	1:1	5,46	5,45 ± 0,01
	0,23	2,73	1: $\sqrt{3}$	5,45	
	0,27	2,35	1: $\sqrt{4}$	5,43	

Abreviações: q : vetor de espalhamento; d : distâncias interplanares; α = parâmetro de rede; α_H = média e DP do parâmetro de rede; NLC = nanodispersão líquido-cristalina; PAH = poli(alilamina hidroclorada); siRNA = *small interfering RNA*.

Análise estatística realizada por One way-ANOVA, pós teste de Tukey, $p < 0,05$: * = NLC sem PAH vs NLC; # = NLC TP sem PAH vs NLC TP; e & = NLC TP vs NLC TP-siRNA.

Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os dados apresentados, pôde-se observar que a incorporação do polímero PAH alterou significativamente o parâmetro de rede médio ($p < 0,05$) das NLCs (Figura 17 A). Uma redução de 0,69 nm (11,76%) entre a NLC sem e com PAH foi observada, assim como houve uma diminuição de 0,74 nm (11,9%) para o parâmetro de rede médio das NLC TP sem e com PAH. Este resultado esta

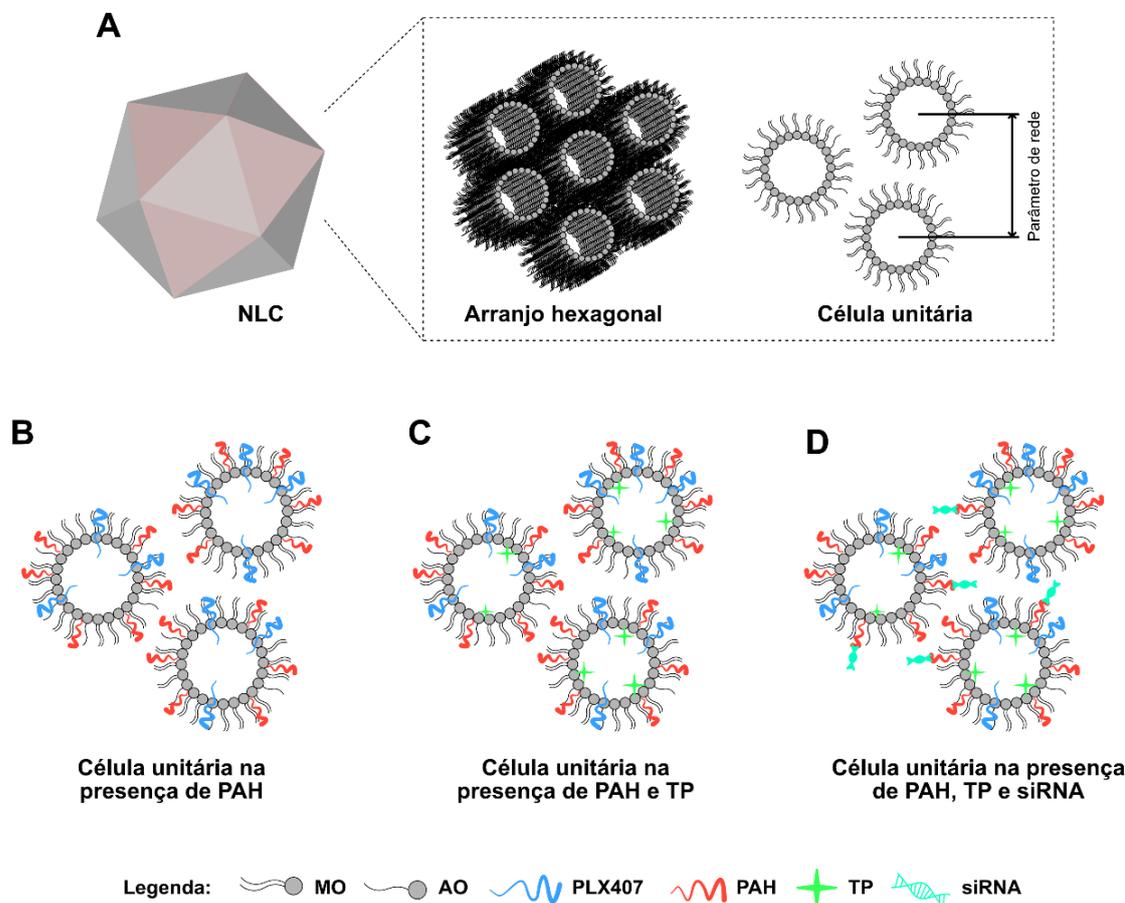
relacionado com a diminuição de água interfacial (AMAR-YULI *et al.*, 2007; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). Desta forma, a presença do polímero com caráter hidrofílico, faz com que ocorra uma diminuição do número de moléculas de água disponíveis para hidratar os grupos hidrofílicos de monoleína (**Figura 17 B**), e esse processo de desidratação aumenta a mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos, resultando em aumento da curvatura e redução concomitante do parâmetro de rede (AMAR-YULI *et al.*, 2007; MISHRAKI-BERKOWITZ; ASERIN; GARTI, 2017).

Além disso, sugere-se que, com a diminuição do parâmetro de rede e conseqüentemente dos canais de água, a encapsulação da triptolida tenha sido favorecida (caráter hidrofóbico), bem como, uma melhor interação eletrostática com o siRNA e proteção contra degradação enzimática (KOYNOVA; TENCHOV; MACDONALD, 2015).

Diferente de outros agentes catiônicos, o PAH não mostrou desestabilizar a mesofase líquido-cristalina ou induzir transições de fase. Estudos anteriores reportaram este efeito em NLCs com PEI ou oleilamina, mesmo em concentrações de 0,5%, além de um aumento no parâmetro de rede (VICENTINI *et al.*, 2013a; PETRILLI *et al.*, 2016; TOFANI *et al.*, 2018). A adição de DOTAP em diferentes concentrações também resultou em alterações no parâmetro de rede. Os autores sugeriram que o aumento da dimensão das células unitárias decorreu devido a necessidade de acomodação das volumosas moléculas de DOTAP entre os canais da estrutura cúbica, além da repulsão eletrostática, levando a um inchaço (ASTOLFI *et al.*, 2017). Kim e Leal (2015) também relataram essas alterações com DOTAP em NLCs cúbicas PEGuiladas (KIM; LEAL, 2015).

Em relação à incorporação da triptolida, a preservação dos valores do parâmetro de rede sugere que a mesma esteja localizada nas cadeias de hidrocarbonetos da monoleína, ou ainda, adsorvidas na superfície das micelas invertidas (**Figura 17 C**) (AMAR-YULI *et al.*, 2007; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). Lopes *et al.* (2006) e Rossetti *et al.* (2011) também relataram a manutenção dos parâmetros de rede e preservação da estrutura de NLCs hexagonais a base de monoleína e ácido oleico incorporadas com ciclosporina A e protoporfirina IX (LOPES *et al.*, 2006; ROSSETTI *et al.*, 2011). Por outro lado, a ocorrência de alterações na estrutura foram relacionadas com o estado de hidratação das moléculas ou o grau de interação com a mesofase (RODRIGUES *et al.*, 2016; ASTOLFI *et al.*, 2017; MEI *et al.*, 2018).

Figura 17 - Representação esquemática da mesoestrutura hexagonal reversa e influência de aditivos na estrutura. [A] NLC hexagonal reversa, arranjo hexagonal reverso e representação do parâmetro de rede (α). Células unitárias do arranjo hexagonal reverso na presença dos aditivos [B] PAH, [C] PAH e triptolida e [D] PAH, triptolida e siRNA.



Fonte: do autor, 2020.

A análise de SAXS das NLCs após complexação com siRNA evidenciou uma ligeira redução do parâmetro de rede, de 0,0354 nm (0,64%) e 0,1333 nm (2,42%) para NLC e NLC TP, respectivamente (**Figura 17 D**). Resultados semelhantes também foram relatados em estudos anteriores do grupo (VICENTINI *et al.*, 2013a; TOFANI *et al.*, 2018). Este fato pode ser explicado pela atração das moléculas de siRNA pelo polímero catiônico, localizado externamente, levando a uma redução do parâmetro de rede (VICENTINI *et al.*, 2013a).

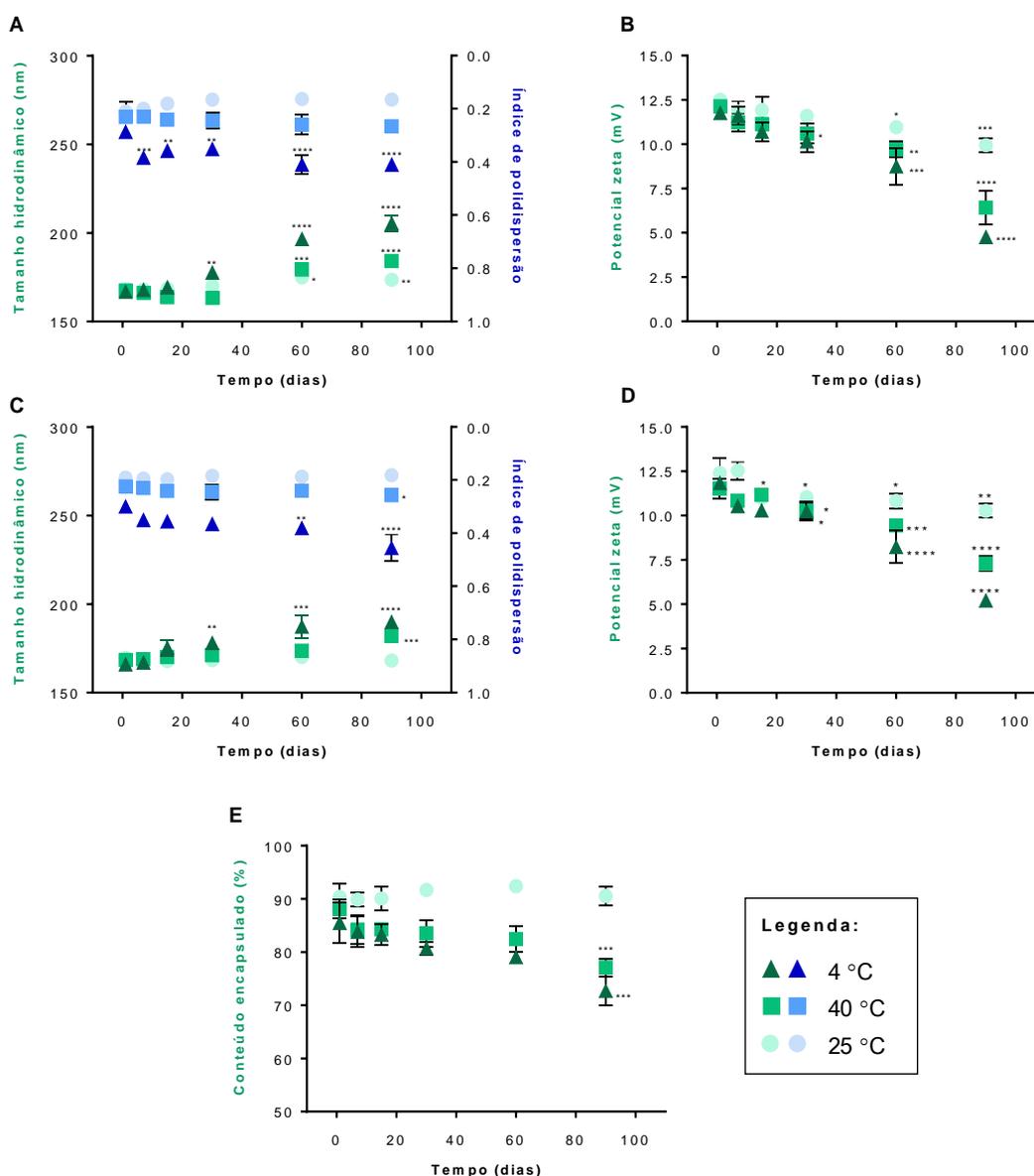
Por fim, também foi possível determinar que a presença do polímero espessante HEC não alterou o parâmetro de rede das NLCs. Este resultado está de acordo com as características hidrofílicas e o modo de incorporação da HEC na formulação, a qual foi adicionada à dispersão após a formação das NLCs. Assim, este aditivo não promoveria alterações ou interações com as micelas da estrutura líquido-cristalina (ROSSETTI *et al.*, 2011).

4.2.2.4. Estudos de estabilidade física e química das NLCs

A estabilidade física das NLC e NLC TP foram avaliadas pelas medições de diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, PDI e potencial zeta, durante um período de 90 dias sob diferentes condições (4 °C; 25 °C e 40 °C) de armazenagem. O conteúdo encapsulado de TP também foi avaliado.

Os dados obtidos para NLC e NLC TP estão apresentados na **Figura 18**.

Figura 18 - Representação gráfica dos dados de estabilidade física e química das NLCs sob diferentes condições de armazenagem durante um período de 90 dias. Medidas de diâmetro hidrodinâmico médio de partícula, polidispersão e potencial zeta para [A-B] NLC e para NLC TP [C-D]. Conteúdo de triptolida encapsulado nas NLC-TP [E]. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados obtidos, ambas as formulações, mostraram-se fisicamente estáveis por aproximadamente 30 dias em temperatura ambiente e em condição acelerada (40 °C). No entanto, foi observado em um período de 30 a 90 dias um aumento progressivo no diâmetro das partículas ($p \leq 0,0001$) para as NLCs armazenadas a 40 °C e um ligeiro aumento ($p < 0,01$) para as NLCs armazenadas a 25 °C (**Figura 18 A; C**). A 40 °C o diâmetro de partícula das NLC variou de $162,40 \pm 1,70$ a $183,40 \pm 3,12$ nm, enquanto que para as NLC TP a variação foi de $170,90 \pm 3,35$ para $182,2 \pm 1,50$ nm. O PDI de ambas as formulações variou ligeiramente, não atingindo valores acima de 0,3 nessas condições de armazenagem (**Figura 18 A; C**). Por outro lado, foi observado um rápido declínio do potencial zeta das formulações armazenadas à 40 °C, atingindo valores finais de $6,64 \pm 0,92$ mV e $7,2 \pm 0,41$ mV para NLC e NLC TP, respectivamente. A 25 °C os valores de potencial zeta não diminuíram mais que 9 mV até 90 dias para ambas as formulações (**Figura 18 B; D**). Em relação ao conteúdo de triptolida presente nas NLC TP, uma diminuição foi observada quando armazenadas a 40 °C ($p < 0,001$) (**Figura 18 E**).

Sob armazenagem a 4 °C, a estabilidade física das NLCs foi comprometida em tempos de armazenagem ainda mais curtos. Macroscopicamente a separação de fase foi observada após 30 dias de armazenamento, e os parâmetros analisados também foram alterados a partir desse tempo. As NLC e NLC TP apresentaram um aumento do diâmetro de partícula, atingindo valores de $207,6 \pm 4,57$ nm e $188,3 \pm 3,52$ nm, respectivamente (**Figura 18 A; C**). Acompanhado a essas alterações, a polidispersão aumentou, com valores acima de 0,4 (**Figura 18 A; C**), enquanto que o potencial zeta diminuiu acentuadamente, com valores menores que 5 mV para ambas as formulações (**Figura 18 B; D**). Nesta condição, o conteúdo encapsulado de triptolida também foi reduzido ($p < 0,001$) (**Figura 18 E**).

Os resultados encontrados neste estudo de estabilidade estão em concordância com o reportado na literatura. NLCs apresentam, preferencialmente, melhor estabilidade quando armazenadas em temperatura de 25 °C (BOYD *et al.*, 2006; YOO *et al.*, 2014; CHOUNTOULESI *et al.*, 2018). Em condições de refrigeração, as alterações bruscas nos parâmetros físicos podem estar relacionadas a cristalização da monoleína dispersa coloidalmente (QIU; CAFFREY, 2000; SIEKMANN *et al.*, 2002). Por sua vez, a notável estabilidade química pode ser explicada pelo aprisionamento da triptolida nos domínios hidrofóbicos da bicamada da mesofase hexagonal e as interações da molécula no ambiente lipídico. Na literatura, as NLCs

mostraram manter a estabilidade química ao longo do tempo para uma série de moléculas bioativas, como irinotecano, ftalocianina de zinco e cloroalumínio, protoporfirina IX, curcumina, quercetina, progesterona e resveratrol (SILVESTRINI *et al.*, 2020).

Em estudos anteriores do grupo, NLCs sem polímeros ou lipídeos catiônicos ou fármacos mantiveram-se estáveis por mais de 90 dias em temperatura ambiente e em condições aceleradas (ROSSETTI *et al.*, 2011, 2016). A estabilidade é atribuída à presença do poloxamer 407. De acordo com a literatura, a região hidrofóbica (poli-óxido de propileno) se dissolve dentro dos domínios lipídicos da estrutura líquido-cristalina, enquanto que as cadeias hidrofílicas (poli-óxido de etileno) se estendem para o meio aquoso, assim, como resultado, a superfície das NLCs não se agregam (DE CAMPO *et al.*, 2004; AKBAR *et al.*, 2017; BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018). Concentrações acima 0,4% (m/m) em relação à fase aquosa são requeridas para produzir NLCs estáveis (GUSTAFSSON *et al.*, 1997; AMAR-YULI *et al.*, 2007; WORLE *et al.*, 2007).

Adicionalmente, em nossos resultados, observamos a influência do PAH na estabilidade a longo prazo. Este polímero, certamente, pode ter contribuído para as alterações encontradas. Foi reportado que, de acordo com a projeção dos segmentos moleculares moveis e imóveis do PAH na superfície de nanopartículas pode contribuir adicionalmente para uma estabilidade estérica fornecida pelo poloxamer 407, além da estabilização eletrostática (facilitando as repulsões partícula-partícula em baixa força-iônica) (ZHANG *et al.*, 2017b; HIMMELSTOSS; HIRSCH, 2019).

4.2.2.6. Caracterização dos hidrogéis contendo as NLCs

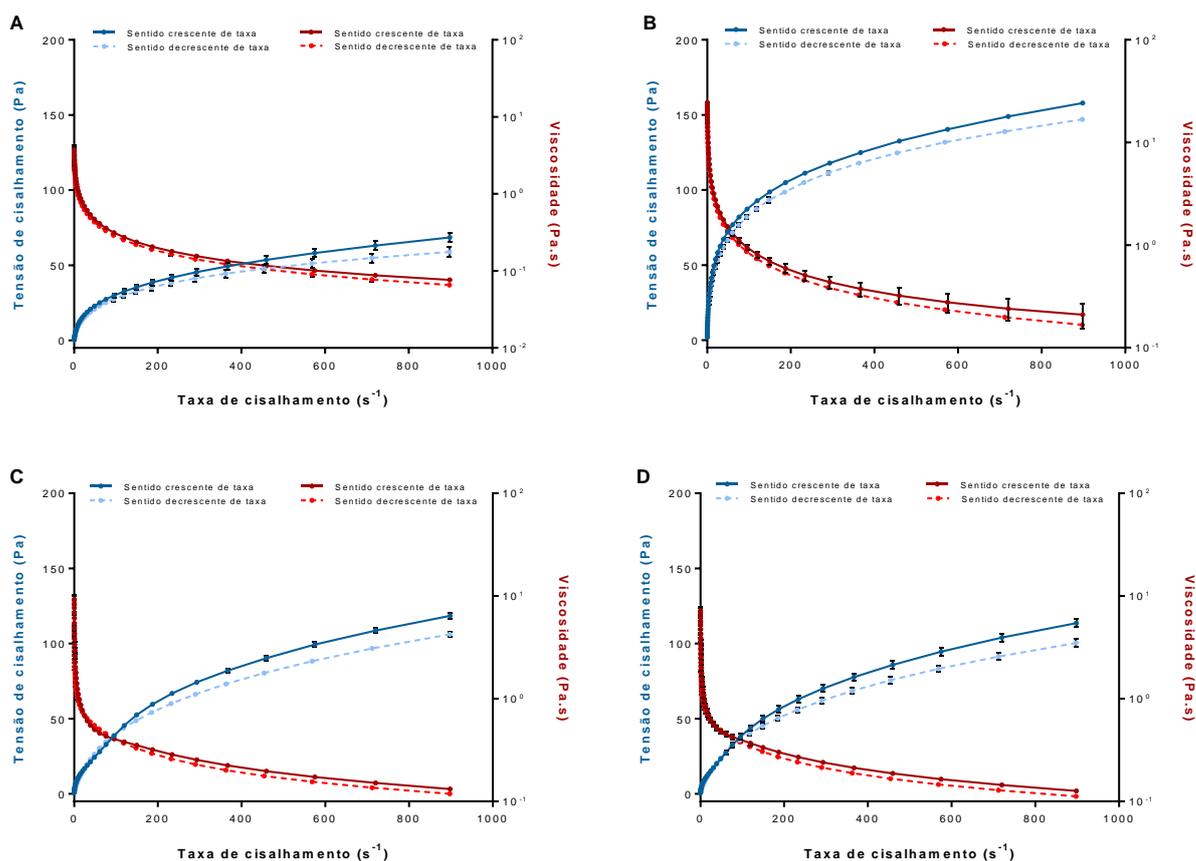
4.2.2.6.1. Comportamento reológico

Os hidrogéis possuem propriedades físicas, químicas e mecânicas que podem ser projetadas para uma ampla gama de aplicações na medicina. A sua combinação com dispersões de nanopartículas apresenta vantagens para fornecer um controle adicional sobre a liberação espacial e temporal do fármaco, além de permitir melhor aplicabilidade e espalhabilidade (DESFRAŊÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018).

Com esse objetivo, foi proposto aumentar a viscosidade das NLCs com a incorporação de HEC, de modo a obter um hidrogel viscoso e com características adequadas para aplicação tópica. Posteriormente, os hidrogéis foram caracterizados quando às suas propriedades reológicas. Os reogramas obtidos estão apresentados

na **Figura 19** e mostram as variações de viscosidade aparente e tensões de cisalhamento *versus* a taxa de cisalhamento.

Figura 19 - Reogramas referentes às variações de viscosidades aparentes e tensões de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. [A] Hidrogel puro; [B] TP-Hidrogel; [C] Hidrogel contendo NLC; e [D] Hidrogel contendo NLC-TP. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 formulações independentes).



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os reogramas, todos os hidrogéis, contendo ou não as NLCs, apresentaram uma relação não-linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, característico de fluidos não-Newtonianos. Ainda, a redução da viscosidade aparente em função do fluxo de cisalhamento é característico de pseudoplastia, e em relação ao tempo, a presença da área de histerese classifica-os como fluidos tixotrópicos (YAMAGUCHI, 2008). Essas características conferem vantagens às formulações dermatológicas, que exigem maior flexibilidade na administração de medicamentos (LEE; MOTURI; LEE, 2009; GHICA *et al.*, 2016).

A área de histerese é observada quando as curvas de fluxo apresentam distinção entre as curvas ascendentes e descendentes de cisalhamento, assim, quanto maior a área compreendida, maior o efeito tixotrópico. Os valores encontrados foram de $5108,5 \pm 92,5$; $5408,3 \pm 70,5$; $7178,7 \pm 57,1$; e $8032,5 \pm 58,5$ Pa/s para hidrogel puro, TP-hidrogel, hidrogel contendo NLC e hidrogel contendo NLC TP, respectivamente. Maiores valores de tixotropia foram obtidos para os hidrogéis contendo as NLCs (One-way ANOVA pós teste de Tukey, $p < 0.001$). Tal fato pode ser explicado pelos maiores valores de viscosidade aparente, o que permite uma redução relativa dessa grandeza mais significativa durante o cisalhamento. Essa facilidade em recuperar gradualmente a forma semi-sólida com a remoção da tensão de cisalhamento pode favorecer a espalhabilidade e uniformidade das preparações sobre a superfície cutânea (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; LEE; MOTURI; LEE, 2009; SILVA *et al.*, 2012; GHICA *et al.*, 2016).

A descrição do comportamento reológico é feita por meio de modelos matemáticos que relacionam as alterações nas tensões de cisalhamento do material em função das taxas de cisalhamento a ele aplicada. Diferentes modelos matemáticos foram aplicados aos dados obtidos, como apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Coeficiente de correlação (R^2) para os diferentes modelos matemáticos

<i>Formulação</i>	<i>Newtoniano</i>	<i>Bingham</i>	<i>Casson</i>	<i>Power Law</i>	<i>Herschel-Bulkley</i>
<i>Hidrogel</i>	$0,634 \pm 0,002$	$0,818 \pm 0,001$	$0,914 \pm 0,001$	$0,994 \pm 0,001$	$0,999 \pm 0,001$
<i>TP-Hidrogel</i>	$0,284 \pm 0,003$	$0,722 \pm 0,009$	$0,857 \pm 0,006$	$0,989 \pm 0,001$	$0,999 \pm 0,001$
<i>NLC-hidrogel</i>	$0,814 \pm 0,002$	$0,898 \pm 0,001$	$0,957 \pm 0,001$	$0,994 \pm 0,001$	$0,996 \pm 0,001$
<i>NLC TP-hidrogel</i>	$0,822 \pm 0,008$	$0,898 \pm 0,004$	$0,956 \pm 0,002$	$0,993 \pm 0,001$	$0,996 \pm 0,001$

Abreviações: TP = triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina.

Os dados são apresentados pela média \pm DP (n = 3 formulações independentes).

Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os coeficientes de correlação obtidos para cada modelo matemático aplicado, os dados reológicos foram melhores representados pelo modelo de Herschel-Bulkley ($R^2 > 0,99$), o qual, caracteriza fluidos que necessitam de uma tensão inicial para começar a escoar, e a tensão experimentada pelo fluido está relacionada ao estresse de maneira complexa e não linear (MULLINEUX, 2008). Essa

relação é caracterizada por três parâmetros: índice de consistência (k), índice de escoamento (η) e limite de cisalhamento (τ_0), que estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Parâmetros reológicos de acordo com o modelo de Herschel-Bulkley

<i>Formulação</i>	<i>k (Pa.s)</i>	<i>τ_0 (Pa)</i>	<i>η</i>
<i>Hidrogel</i>	6,91 ± 0,16	-3,87 ± 0,07	0,35 ± 0,03
<i>TP-Hidrogel</i>	7,01 ± 0,11	-3,97 ± 0,89	0,22 ± 0,01
<i>NLC-hidrogel</i>	4,05 ± 0,14 **	-0,90 ± 0,11 *	0,50 ± 0,01 *
<i>NLC TP-hidrogel</i>	3,87 ± 0,53 **	-1,28 ± 0,29 *	0,50 ± 0,02 *

Abreviações: TP = triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina.

Legenda: k = índice de consistência; τ_0 = limite de cisalhamento; η = índice de escoamento.

Os dados são apresentados pela média ± DP ($n = 3$ formulações independentes).

Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (** $p \leq 0,0001$ e * $p < 0,001$).

Fonte: do autor, 2020.

Na literatura, hidrogéis preparados com polímeros derivados da celulose e associados ou não com dispersões de nanopartículas são, em sua grande maioria, caracterizados pelo modelo de Herschel-Bulkley e de Power Law, corroborando com os resultados obtidos (CLARES *et al.*, 2014; DESFRANÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2019; RIGON *et al.*, 2019; TUNG; VU; NGUYEN, 2019).

Os valores de η quando < 1 indicam propriedades pseudoplásticas (GHICA *et al.*, 2016), confirmando a projeção gráfica dos reogramas apresentados anteriormente (**Figura 19**). Um aumento de η foi observado para os hidrogéis contendo as NLCs, com valores acima de 0,5, o que está relacionado com maior escoamento da formulação. De acordo com Silva *et al.* (2012), valores mais altos desse parâmetro confere melhor aplicação local e estabilidade para formulações semi-sólidas durante o armazenamento (SILVA *et al.*, 2012).

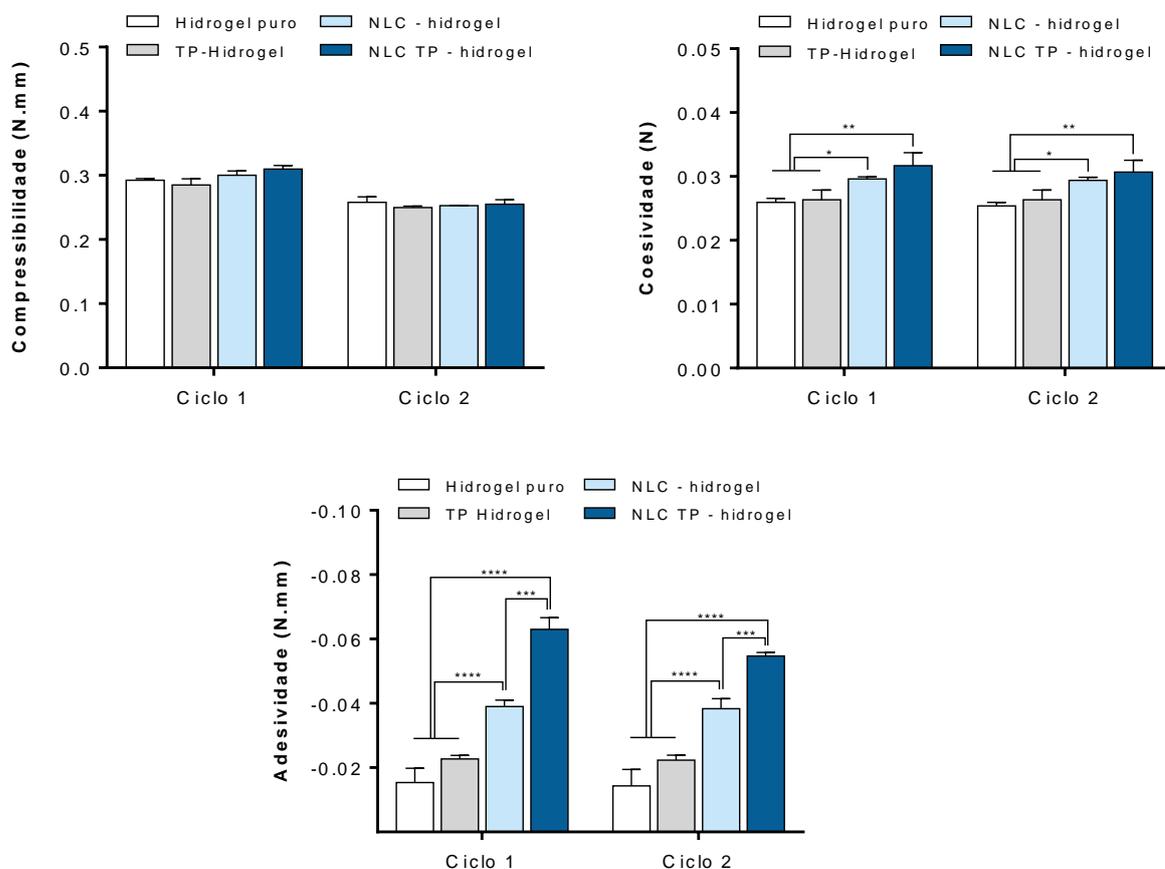
Por outro lado, essas formulações em comparação ao hidrogel puro e ao TP-hidrogel apresentaram uma diminuição de k ($p < 0,0001$), o qual reflete as alterações na consistência do hidrogel, e de τ_0 ($p < 0,001$), relacionado ao estresse que o fluido pode experimentar antes de produzir e começar a fluir. O conteúdo lipídico das dispersões e sua influência sobre a consistência final do hidrogel podem ter refletido sobre esses parâmetros (SILVA *et al.*, 2012; CLARES *et al.*, 2014). De modo geral as características apresentadas pelos hidrogéis contendo as NLCs são favoráveis para

medicamentos de aplicação tópica (KHURANA; BEDI; JAIN, 2013; GHICA *et al.*, 2016).

4.2.2.6.2. Perfil de textura e bioadesividade

Ao projetar um sistema de administração tópica de medicamentos, a dureza, coesão e adesividade do veículo são fatores importantes, e é essencial manter um equilíbrio adequado entre esses fatores. As informações derivadas dos estudos de textura têm demonstrado correlação com o desempenho de um material *in vivo* (HURLER *et al.*, 2012; GILBERT *et al.*, 2013; CALIXTO; INFANTE; MAIA CAMPOS, 2018). Desta forma, as propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas e os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 20**.

Figura 20 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a análise do perfil de textura dos hidrogéis. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 formulações independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com dados obtidos, nenhuma diferença significativa foi determinada para a compressibilidade entre os hidrogéis contendo ou não as NLCs. Isso indica que a presença das partículas não alterou o trabalho necessário para deformar a formulação durante a compressão da sonda. Por outro lado, a presença das NLCs influenciou na coesividade e adesividade das formulações. Entre os ciclos (1 e 2), os valores foram próximos, e desta forma, consideramos apenas o primeiro ciclo para discussão dos resultados.

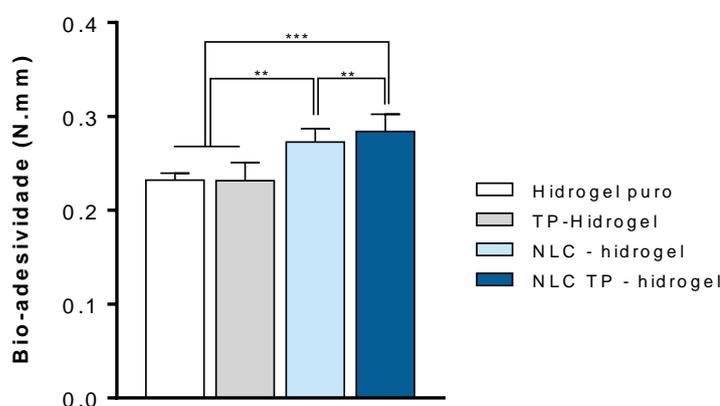
O hidrogel contendo as NLC e o hidrogel contendo as NLC TP apresentaram uma média de coesividade de $0,027 \pm 0,001$ N e $0,031 \pm 0,002$ N, respectivamente, enquanto que, para o hidrogel puro ou contendo apenas a triptolida, foi determinado uma coesividade de $0,025 \pm 0,001$ N e $0,026 \pm 0,001$ N, respectivamente. Este parâmetro avalia a capacidade do material em se manter unido, e é medido como a taxa na qual o material é desintegrado sob ação mecânica. Desta forma, o aumento significativo deste parâmetro para os hidrogéis contendo as dispersões indica uma maior coesão e força necessária para que o mesmo seja desintegrado.

Para a adesividade, parâmetro que avalia a energia necessária para superar as forças de atração entre a superfície do material de análise e a superfície de outros materiais com os quais entra em contato, foi observado um aumento significativo para os hidrogéis contendo as dispersões. Os valores foram de $-0,039 \pm 0,002$ e $-0,064 \pm 0,003$ N.mm para o hidrogel contendo as NLC e o hidrogel contendo as NLC TP, respectivamente, sendo estes valores significativamente maiores quando comparado aos hidrogéis sem NLCs, que variou de $-0,01$ a $-0,02$ N.mm. Tais resultados indicam a influência direta do conteúdo das NLCs sobre a adesividade final do hidrogel, considerando que as dispersões apresentam um conteúdo lipídico que pode favorecer o aumento deste parâmetro.

Uma correlação entre o comportamento mecânico examinado e a viscosidade dos hidrogéis foi claramente exibida. Observou-se que o hidrogel contendo as NLCs, com a maior viscosidade, exibia a estrutura mais espessa e firme, além da maior capacidade de adesão. Além disso, a presença das NLCs compostas principalmente por lipídeos, juntamente com a HEC pode favorecer a capacidade de espalhamento, importante atributo sensorial (GILBERT *et al.*, 2013). As alterações observadas nos parâmetros texturais podem favorecer a aplicação e prolongar o tempo de contato nas lesões cutâneas específicas (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; HURLER *et al.*, 2012; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

Para melhor investigar as propriedades adesivas, foi realizado o teste de cisalhamento em peles de orelhas suínas. Esta membrana biológica foi escolhida como substrato devido à sua estrutura anatômica geral, espessura, conteúdo de colágeno e lipídios e resistência mecânica sendo comparável à da pele humana (PUERTAS-BARTOLOMÉ *et al.*, 2019). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 21**.

Figura 21 - Representação gráfica da bioadesividade dos hidrogéis em membrana suína. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$).



Fonte: do autor, 2020.

A análise de bioadesividade mostrou que a presença do hidrogel contendo as NLCs apresentaram um aumento da bioadesividade ($p < 0,001$), ou seja, a força necessária para deslocar essas formulações da membrana foi maior comparada às outras formulações. Este fato pode ser atribuído à composição lipídica das dispersões e a sua carga residual positiva. É sabido que a presença de cargas positivas favorece interações químicas intermoleculares e interfaciais com diferentes grupos funcionais encontrados em proteínas, peptídeos e carboidratos do tecido biológico (PUERTAS-BARTOLOMÉ *et al.*, 2019; RIGON *et al.*, 2019).

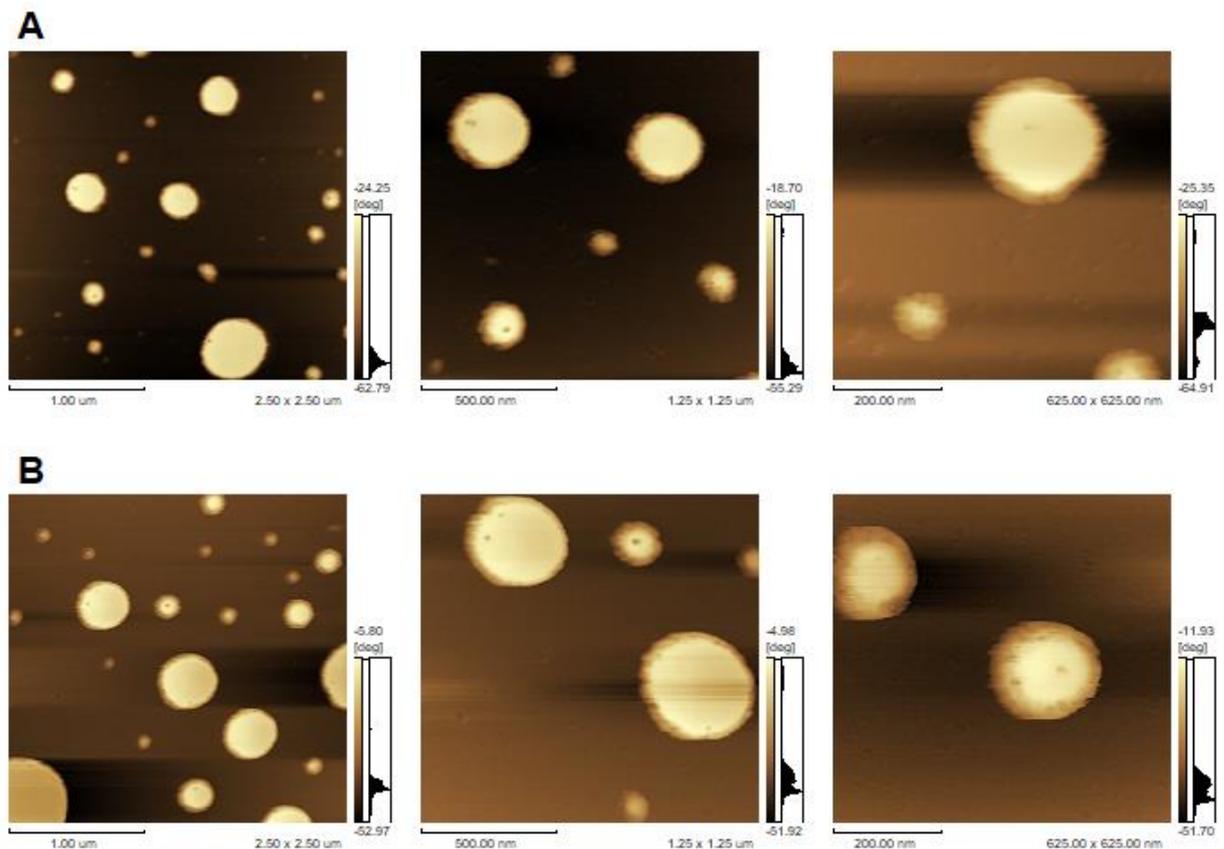
A força de adesão, medida para cada hidrogel, é um fenômeno complexo composto por múltiplos processos únicos e diferentes eventos devem ser considerados. Além disso, os hidrogéis são projetados para serem aplicados às lesões psoriáticas, em um microambiente diferente da pele intacta, a qual foi utilizado nos ensaios, e desta forma, o pH do local lesionado (ácido), o processo inflamatório e a

presença de escamas superficiais podem alterar o padrão de bioadesividade, favorecendo a formação de um gel mais viscoso e aderente (PAGANO *et al.*, 2019).

4.2.3. Caracterização morfológica das NLCs

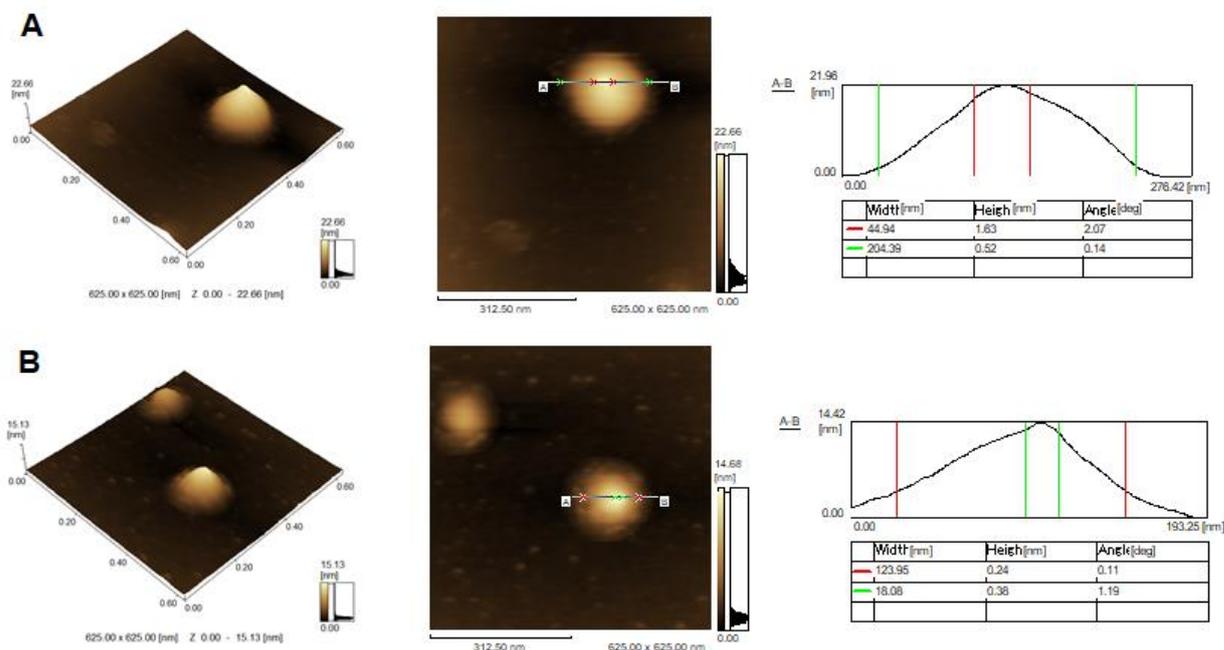
Durante o desenvolvimento de novos materiais em escala nanométrica o conhecimento da morfologia é importante para elucidar e caracterizar suas propriedades de “estrutura-atividade”, pois, características como forma, tamanho e propriedades de superfície exercem efeitos diretos no desempenho biológico (MANAIA *et al.*, 2017; RAWAL; SINGH; AMIJI, 2019). As NLCs foram caracterizadas morfológicamente por AFM, como apresentado nas **Figuras 22 e 23**.

Figura 22 - Fotomicroscopias bidimensionais (de fase) representativas obtidas por AFM das NLCs. [A] NLC; e [B] NLC TP. Escalas de 1 μ m, 500 nm e 200 nm.



Fonte: do autor, 2020.

Figura 23 - Fotomicroscopias tridimensionais representativas e histograma obtidos por AFM das NLCs. [A] NLC; e [B] NLC TP.



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com as imagens adquiridas por AFM é possível obter informações topográficas das NLCs em análise. De acordo com a **Figura 22 (A-B)**, as imagens adquiridas no modo de fase possibilitam distinguir materiais com propriedades mecânicas distintas, como dureza e elasticidade. Desta forma, ambas as NLCs apresentam predominantemente regiões claras em sua superfície, evidenciando as características maleáveis das partículas formadas por monoleína e ácido oleico. Alguns pontos são mais escuros que a superfície total da NLCs-TP, correspondendo a microdomínios de menor visco-elasticidade, os quais podem estar relacionados à presença da triptolida na nanoestrutura (JAMES *et al.*, 2001; CHAFIDZ *et al.*, 2012; BOLEAN *et al.*, 2017).

Podemos observar nessas imagens, principalmente na escala de 1 μm , a presença de partículas/vesículas ou artefatos menores que as NLCs. Na literatura, a presença de vesículas uni- ou multi-lamelares foi relatada por diversos autores e está intrinsecamente relacionado ao método de produção empregado (MULET; BOYD; DRUMMOND, 2013; AKBAR *et al.*, 2017; SILVESTRINI *et al.*, 2020). Nos últimos anos, diferentes estratégias têm sido empregadas para eliminar a presença dessas vesículas, como tratamento térmico, diálise e extrusão em membrana (LANCLOT; SIERRA; SERRANO, 2014; ANGELOVA *et al.*, 2017).

Em relação ao formato, esperava-se a visualização da estrutura facetada das NLCs hexagonais, no entanto, nem sempre é possível observar as facetas nítidas, e esta característica pode ser devido aos atritos exercidos pela varredura da ponta na amostra (NETO *et al.*, 1999). No entanto, a representação topográfica tridimensional e o histograma nos (**Figura 23 A-B**) revelam que as NLCs apresentam dimensões distintas entre a altura e largura, bem como não apresentam um formato esférico, o que é observado nas imagens 2 D.

A altura calculada é definitivamente abaixo da altura esperada, que deveria estar próxima a dimensão lateral. No entanto, isso pode ser explicado pela influência de vários fatores intrínsecos relacionados à técnica e as características maleáveis das NLCs, como força exercida pela sonda oscilante sobre a amostra e ao fenômeno de adsorção das partículas na superfície da mica (NETO *et al.*, 1999).

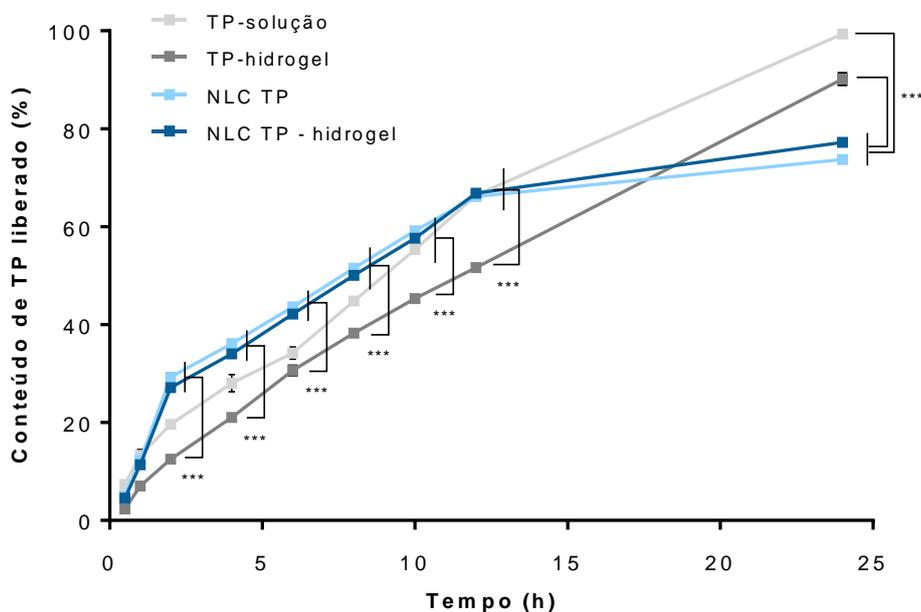
4.2.4. Estudos em célula vertical de difusão de Franz

4.2.4.1. Liberação cutânea em membrana sintética

Nos ensaios de liberação utilizando célula vertical de difusão de Franz, as formulações de estudo (NLC TP e NLC TP-hidrogel) e veículos controles (solução e hidrogel) foram avaliadas quanto a sua capacidade de liberar a triptolida em função do tempo (SHEN; BURGESS, 2013). A condição *sink* foi previamente avaliada, considerando que a concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação fosse menor que 10 % da sua concentração de saturação (USP38/NF33, 2015; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

As concentrações de triptolida obtidas no compartimento receptor foram determinadas e plotadas graficamente em porcentagem em relação a dose inicial aplicada (166,6µg), como mostrado na **Figura 24**. Posteriormente, os dados foram ajustados a modelos matemáticos: (i) ordem zero (concentração vs tempo), (ii) primeira ordem (log da concentração vs tempo) e (iii) cinética de Higuchi (concentração vs raiz quadrado do tempo) (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). Os coeficientes de correlação calculados estão apresentados na **Tabela 11**.

Figura 24 - Perfil de liberação da triptolida em membrana sintética de celulose utilizando célula vertical de difusão de Franz. Ensaio realizado com triptolida em solução (propilenoglicol:água, 1:5, v/v), triptolida incorporada no hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 µg). Os dados do conteúdo liberado são apresentados pela média ± DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (***) $p < 0,0001$.



Fonte: do autor, 2020.

Tabela 11 - Modelos cinéticos de liberação da triptolida.

Formulação	Cinética	Equação da reta	Coefficiente de correlação
TP-solução	Ordem zero	$y = 6,523x + 19,26$	0,975
	Primeira ordem	$y = 0,042x + 1,400$	0,768
	Higuchi	$y = 33,28x - 14,81$	0,927
TP-hidrogel	Ordem zero	$y = 6,163x + 3,577$	0,996
	Primeira ordem	$y = 0,095x + 0,898$	0,831
	Higuchi	$y = 27,81x - 21,43$	0,976
NLC TP	Ordem zero	$y = 8,135x + 18,89$	0,915
	Primeira ordem	$y = 0,075x + 1,28$	0,710
	Higuchi	$y = 35,09x - 11,55$	0,982
NLC TP hidrogel	Ordem zero	$y = 8,262x + 16,26$	0,911
	Primeira ordem	$y = 0,079x + 1,239$	0,724
	Higuchi	$y = 35,40x - 14,16$	0,986

Abreviações: TP = triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina.
Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que a triptolida presente nas NLC TP ou nas NLC TP-hidrogel foi rapidamente liberada dentro de 12 horas de estudos (aproximadamente 60% da dose aplicada) e seguida de liberação prolongada de 12 a 24 h (aproximadamente 77% da dose aplicada). A presença da reticulação da HEC não alterou o perfil de liberação da triptolida nas NLCs. Um efeito de explosão (efeito *burst*) foi observado nas primeiras horas do perfil de liberação para ambas as formulações, sugerindo que, embora a maioria do conteúdo de triptolida tenha sido encapsulado no interior da mesofase líquido-cristalina, o fármaco livre (aproximadamente 10%, de acordo com os resultados obtidos pela EE%) ou adsorvido na superfície da partícula foi rapidamente liberado neste intervalo de tempo inicial. A cinética de liberação, neste caso, foi melhor ajustada ao modelo de Higuchi (quantidade de medicamento liberado *versus* raiz quadrada do tempo), modelo matemático amplamente conhecido por descrever a liberações controladas/sustentadas (SIEPMANN; PEPPAS, 2011). Para as formulações controle, o conteúdo liberado em 24h correspondeu a concentrações acumulativas acima de 90% em relação a dose aplicada, sendo os perfis obtidos melhores ajustados ao modelo de ordem zero (quantidade de medicamento liberado ao longo do tempo), indicando que não há nenhum mecanismo que module a liberação do ativo (COSTA, 2002).

Semelhante ao obtido para a triptolida nas formulações controles, outros estudos reportaram uma rápida liberação em um período igual ou menor que 24 h de estudo (LIN *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2018, 2019). Enquanto que, para sistemas carreadores nanoestruturados, como as NLCs, o modelo de Higuchi é amplamente conhecido por caracterizar a liberação dos ativos carregados (SIEPMANN; PEPPAS, 2011; SILVESTRINI *et al.*, 2020). Uma série de estudos reportaram a liberação sustentada de cetoconazol, tamoxifeno e rosuvastatina em NLCs hexagonais, e resveratrol, ácido alfa-lipóico, ibuprofeno e ondansertrona em NLCs cúbicas (SHERIF; BENDAS; BADAWEY, 2014; GABR; MORTADA; SALLAM, 2017; JAIN *et al.*, 2017; MANSOUR *et al.*, 2017; BADIE; ABBAS, 2018; GAZGA-URIESTE *et al.*, 2019). Outros autores obtiveram uma liberação ainda mais lenta com variações do pH do meio aquoso (URANDUR *et al.*, 2018; GABR; MORTADA; SALLAM, 2017).

De acordo com estudos cinéticos envolvendo matrizes líquido-cristalinas, a liberação sustentada de fármacos com características hidrofóbicas está relacionada com a alta afinidade dessas moléculas pelo conteúdo de monoleína e ácido oleico presentes na arquitetura das micelas invertidas, levando a uma partição desfavorável

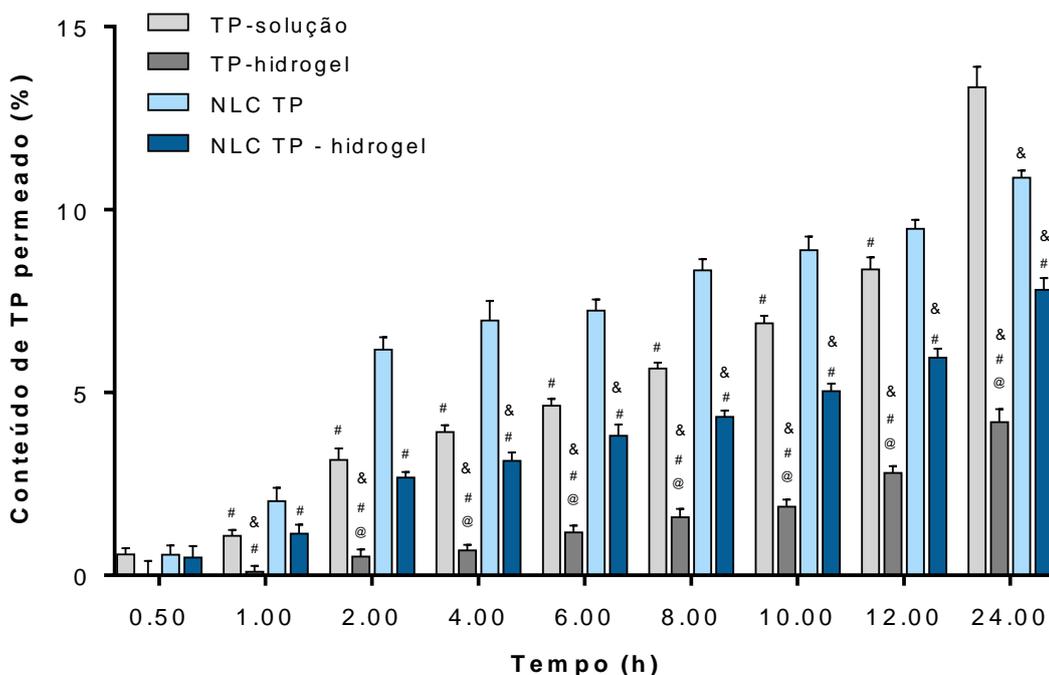
na fase aquosa. O aumento da proporção de monoleína leva a um aumento da viscosidade da matriz, resultando em um atraso na difusão dos ativos na bicamada monoglicerídica para o meio aquoso (SHERIF; BENDAS; BADAWY, 2014; MANSOUR *et al.*, 2017; BADIE; ABBAS, 2018). Além disso, foi observado que a presença do ácido oleico, ao alterar a automontagem do empacotamento lipídico, leva a alterações nas dimensões da rede, diâmetro, grau de tortuosidade e orientação dos canais de água, o que afeta a taxa de difusão do fármaco (MILAK; ZIMMER, 2015; GABR; MORTADA; SALLAM, 2017).

4.2.4.2. Permeação e retenção cutânea em membrana biológica

A permeação e retenção de compostos pela e através da pele tem sido um desafio na terapia de doenças cutâneas, uma vez que a pele se comporta como uma barreira física e biológica (BIBI; AHMED; KHAN, 2017; BELLEFROID *et al.*, 2019). No entanto, estratégias nanotecnológicas buscam superar esse viés para permitir a entrega de medicamentos em concentrações terapeuticamente eficazes e com menores efeitos colaterais (ROBERTS *et al.*, 2017).

Neste contexto, investigar a capacidade de permeação e retenção das NLCs carregadas com triptolida e siRNA faz-se necessário para o desenvolvimento racional desta plataforma. Desta forma, estudos utilizando a pele de orelha suína, que apresenta semelhanças estruturais com a pele humana (PRAÇA *et al.*, 2018), foram conduzidos para as formulações desenvolvidas e os dados obtidos estão apresentados na **Figura 25** e na **Tabela 12**.

Figura 25 - Perfil de permeação da triptolida em pele de orelha suína utilizando célula vertical de difusão de Franz. Ensaio realizado com TP-solução, TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 µg). Os dados do conteúdo permeado são apresentados pela média ± DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,0001$): # = NLC TP vs TP-solução, TP-hidrogel e NLC TP-hidrogel; & = solução vs TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel; e @ = NLC TP-hidrogel vs TP-hidrogel.



Fonte: do autor, 2020.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de permeação *in vitro* da triptolida.

Formulação	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Lag time (h)	Coefficiente de permeação (cm/h)
TP-Solução	$0,87 \pm 0,02$	$2,01 \pm 0,25$	$0,0025 \pm 0,0001$
TP-Hidrogel	$0,31 \pm 0,04$ &#@	$5,82 \pm 0,09$ &#	$0,0010 \pm 0,0002$ &
NLC TP	$0,62 \pm 0,03$ &	$2,85 \pm 0,07$ &@	$0,0031 \pm 0,0001$
NLC TP hidrogel	$0,49 \pm 0,02$ &#	$3,60 \pm 0,09$ &	$0,0018 \pm 0,0002$ &#@

Dados apresentados pela média ± DP (n=5).

Abreviações: TP = triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina.

Análise estatística dos dados realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey ($p < 0,0001$): # = NLC TP vs TP-solução, TP-hidrogel ou NLCTP-hidrogel; & = TP-solução vs TP-hidrogel, NLC TP ou NLC TP hidrogel; e @ = NLC TP hidrogel vs TP-hidrogel.

Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados apresentados, podemos observar que as NLC TP proporcionaram maiores taxas de permeação da triptolida pelas camadas da pele em comparação a triptolida em solução ou no hidrogel. As concentrações acumulativas durante as primeiras 10 h de amostragem foram estatisticamente superiores (p

<0,0001) (**Figura 25**). As NLC TP apresentaram um maior coeficiente de permeação ($0,0031 \pm 0,0001$ cm/h), enquanto que, quando presentes no hidrogel (NLC TP-hidrogel), houve uma diminuição acentuada deste parâmetro para $0,0018 \pm 0,0002$ cm/h ($p < 0,0001$). Para ambas as formulações, os fluxos de permeação foram menores em relação a triptolida em solução ($p < 0,0001$), o que refletiu em um maior *lag time* (tempo necessário até atingir a permeação linear) (**Tabela 12**).

A capacidade de interação da molécula com a pele foi documentada por outros autores, e tem sido um dos grandes desafios para seu uso tópico (CHEN *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2012). Muitos fatores podem estar relacionados, além de sua lipofilicidade. Propriedades físico-químicas baseadas no nível molecular, como o número de ligações de hidrogênio, a superfície de polaridade total e o volume molecular são características que demonstram correlação com a absorção cutânea (TSAKOVSKA *et al.*, 2017).

Na literatura vários estudos reportaram maiores taxas de permeação quando fármacos ou biomacromoléculas foram veiculadas por NLCs (UCHINO *et al.*, 2015; MOHYELDIN; MEHANNA; ELGINDY, 2016; SALAH; MAHMOUD; KAMEL, 2017; BADIE; ABBAS, 2018). Madheswaran *et al.* (2014) especularam que o aumento da permeação das NLCs se deu a um aumento do grau de desordem das cadeias acil lipídicas, resultando no aumento da fluidez do EC. Ainda, foi sugerido que a estrutura líquido-cristalina das NLCs, composição e estrutura química de seus componentes estão associados à maior capacidade de permeação cutânea. O AO interage e modifica os domínios lipídicos das superfícies biológicas, devido a sua longa cadeia de ácido graxo com insaturação *cis* e uma estrutura torcida capaz de interromper e aumentar a fluidez do empacotamento lipídico e, portanto, diminuindo a resistência difusional (LEEKUMJORN *et al.*, 2009). Desta forma, em conjunto com a MO, ocorre um aumento na fluidez do estrato córneo e desestruturação do acondicionamento lipídico intercelular (MADHESWARAN *et al.*, 2014; UCHINO *et al.*, 2019).

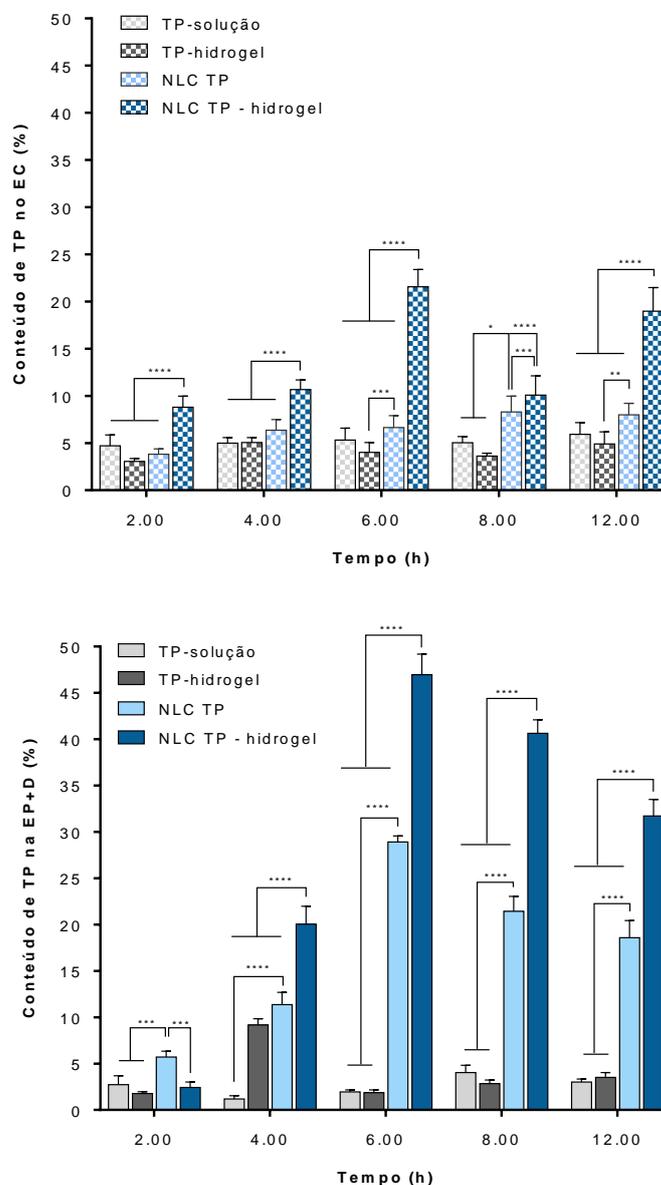
Adicionalmente, podemos observar, nitidamente, que a aplicação de uma formulação mais espessa/ viscosa como o hidrogel diminuiu o conteúdo de triptolida permeado durante o tempo (**Figura 25**). Para as NLC TP-hidrogel ou para TP- hidrogel os menores coeficientes de permeação refletiram na determinação de menores fluxos e um maior *lag-time* (**Tabela 12**), sugerindo desta forma, que, as diferentes formulações podem alterar a atividade termodinâmica do fármaco e conseqüentemente a sua liberação e penetração na pele (CHEN *et al.*, 2004). Comparativamente ao hidrogel

controle, os resultados obtidos estão de acordo com os estudos na literatura, nos quais, as formulações de hidrogeis de carbopol 940 contendo microemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas ou nanoemulsões mostraram aumentar o fluxo e a taxa de permeação da triptolida quando comparados ao hidrogel controle (CHEN, HUABING *et al.*, 2007; MEI, Z. *et al.*, 2008; YANG, M. *et al.*, 2017b).

Além disso, as características reológicas e bioadesivas fornecidas pelo hidrogel à dispersão de NLC/ NLC TP, anteriormente analisadas, podem ter proporcionado um maior permeabilidade pelo estrato córneo, enquanto favorecia maior tempo de residência das NLC TP nas camadas epidérmica e dérmica, e conseqüente uma menor taxa de permeação (DESFRAŒOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018).

Posteriormente, de modo a investigar e compreender as interações das formulações nas diferentes camadas da pele, como estrato córneo (EC) e epiderme viável (EP+D) foi realizado os ensaios de retenção cutânea. Os dados obtidos estão apresentados na **Figura 26**.

Figura 26 - Perfis de retenção da triptolida em pele de orelha suína. Ensaio realizado com TP-solução, TP-hidrogel, NLC TP e NLC TP-hidrogel. Porcentagem de triptolida liberada em relação a dose inicial aplicada (166,6 µg). Os dados do conteúdo retido no EC e na EP+D são apresentados pela média ± DP (n=5). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 26**, podemos observar quantidades significativamente elevadas de triptolida na EP+D quando veiculadas pelas NLC TP ou NLC TP-hidrogel em comparação aos controles (solução e hidrogel) ($p < 0,0001$) em todos os tempos de análise.

Para as NLC TP esse aumento foi equivalente de 2 a 15 vezes, com uma retenção máxima obtida no tempo de 6 h. Neste tempo, o aumento do conteúdo retido

foi de 14,8 vezes em relação à solução, e 15,5 vezes em relação ao hidrogel ($p < 0,0001$) na EP+D. No EC, o conteúdo de triptolida foi superior após o tempo de 6 h ($p < 0,0001$). Ainda, comparativamente ao conteúdo permeado (**Figura 25**), as NLC TP mostraram uma maior retenção de 1,63; 2,61; 1,37 e 1,43 vezes mais triptolida na EP+D nos tempos de 4, 6, 8 e 12 h, respectivamente.

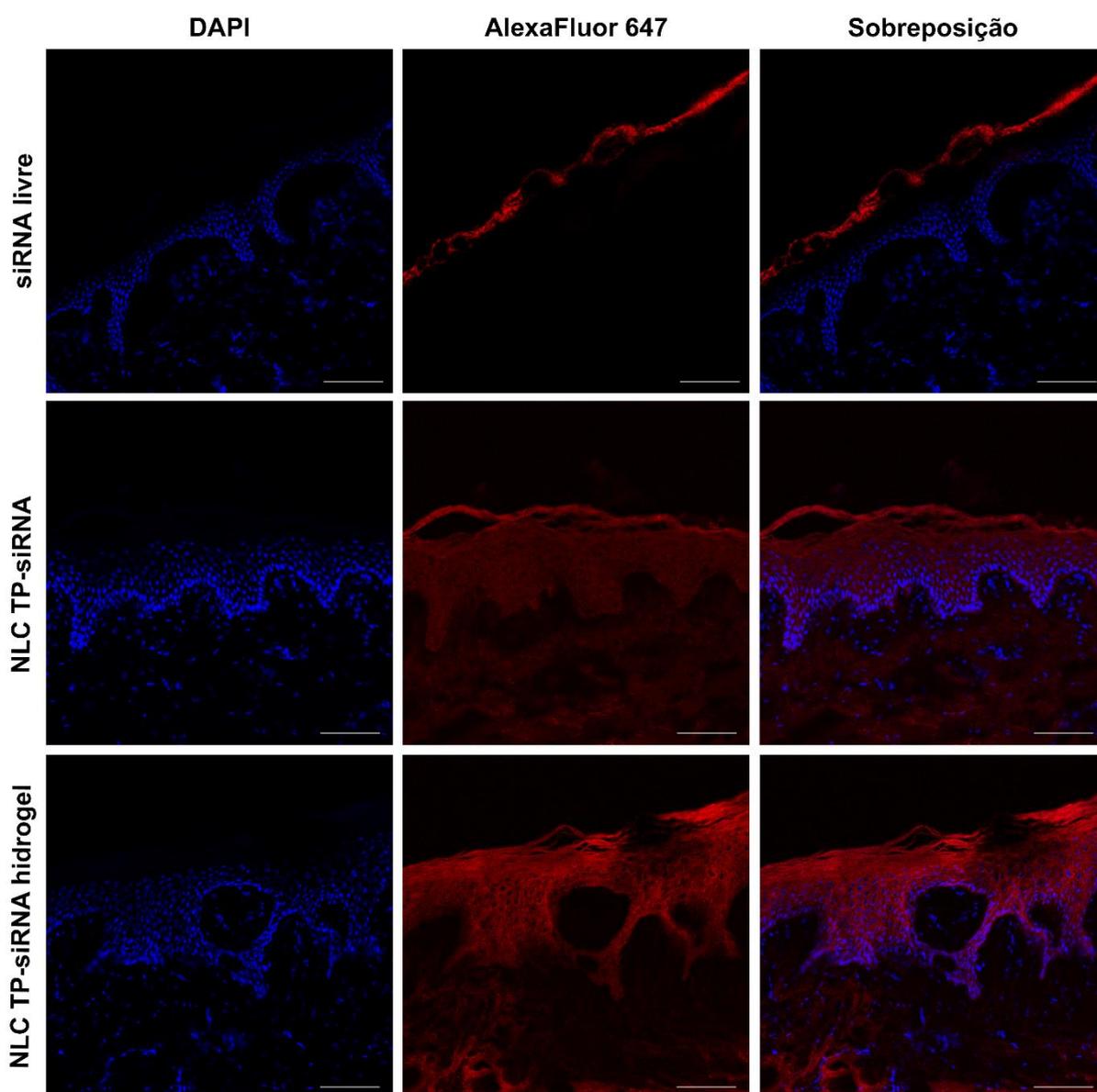
Por outro lado, um aumento significativo das concentrações de triptolida retida no EC e EP+D foram obtidas com as NLC TP-hidrogel em comparação com a NLC TP e os veículos controles. Comparado à solução e ao hidrogel, um aumento de 1,8 a 3,5 vezes nas concentrações de triptolida foram determinadas no EC, enquanto que, na EP+D, houve um aumento de 5 a 17 vezes. Em relação às NLC TP esse aumento foi de 1,2 a 2,8 vezes no EC e de 1,6 a 3,5 na EP+D, principalmente nos tempos superiores a 4 h. No tempo de 6 h um pico máximo de triptolida retida foi determinada no EC e na EP+D. Ainda, o conteúdo retido foi significativamente superior ao encontrado no conteúdo permeado, indicando que, as NLC TP-hidrogel permitiram maior interação e retenção da triptolida na EP+D, limitando a sua permeabilidade para as demais camadas da pele, o que refletiu em menores taxas de fluxo e coeficiente de permeação (**Tabela 12**).

De acordo com esses resultados, em conjunto com o perfil de permeação, é possível inferir que o aumento da retenção da triptolida no EC e na EP+D quando encapsulada nas NLC TP-hidrogel proporcionaram um maior tempo de residência nessas camadas, o que pode estar relacionado com as suas propriedades mecânicas e bioadesividade, como relatado nos estudos anteriores. Este resultado mostrou-se interessante pelo fato de proporcionar que os agentes terapêuticos, no caso a triptolida e as moléculas de siRNA, sejam entregues no local em que a psoríase se manifesta, ou seja, na epiderme e derme. Além disso, evita que elevadas concentrações de triptolida atinja níveis plasmáticos e a ocorrência de efeitos adversos. O uso de hidrogéis associado à nanopartículas é reportado como uma estratégia interessante para fornecer o controle espacial e temporal da entrega dos medicamentos e faz-se uso das suas propriedades adesivas e biocompatíveis, além de permitir um manuseio mais conveniente da amostra e maior conformidade do paciente (DESFRANÇOIS; AUZ; TEXIER, 2018; SOSNIK; SEREMETA, 2017).

Para complementar os dados quantitativos, análises em microscopia confocal de varredura a laser foram realizados para visualização da localização da fluorescência emitida pelo siRNA Alexa Fluor 647 livre ou veiculado nas NLC TP na

membrana biológica. A fluorescência do complexo siRNA-NLC TP nos indica a capacidade nas NLCs em carregar o siRNA pela/ através da pele, e também, indicando indiretamente, a sua localização nas camadas da pele, como referência aos ensaios quantitativos anteriores. As fotomicroscopias representativas dos cortes histológicos estão apresentadas na **Figura 27**.

Figura 27 - Fotomicroscopias representativas de cortes histológicos de pele de orelha suína obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após 6 h de tratamento. Ensaio realizado com amostras contendo siRNA-Alexa Fluor 647 5 μ M livre (água isenta de RNase) e NLC TP-siRNA Alexa Fluor 647 5 μ M. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC TP). A barra de escala corresponde a 100 μ m.



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com as fotomicroscopias obtidas é possível observar que o siRNA em solução não apresenta permeabilidade suficiente para atingir as demais camadas da pele, ficando retido no EC. Isso é amplamente discutido na literatura, e suas características como tamanho e carga dificultam a sua difusão, reforçando dessa maneira, a necessidade de vetores ou nanopartículas para viabilizar o seu transporte e proteção (TATIPARTI *et al.*, 2017; BELLEFROID *et al.*, 2019). Por outro lado, quando complexado nas NLC ou NLC-hidrogel, a fluorescência correspondente ao siRNA é observada por toda a extensão do EC e EP+D. Estudos anteriores do grupo também reportaram a capacidade das NLCs em transportar o siRNA através da pele (VICENTINI *et al.*, 2013a; DEPIERI *et al.*, 2016; PETRILLI *et al.*, 2016).

Em conjunto, os resultados quantitativos e qualitativos obtidos nos ensaios de permeação e retenção cutânea em membrana biológica nos sugerem que as NLCs são apresentadas habilidades competentes de veicular tanto a triptolida como as moléculas de siRNA, permitindo um acúmulo nas regiões epidérmicas de interesse para o tratamento da psoríase. Além disso, o hidrogel proposto para aumentar a viscosidade da dispersão mostrou-se muito promissor ao proporcionar um comportamento bioadesivo e melhorar a interação e retenção das NLCs com a pele.

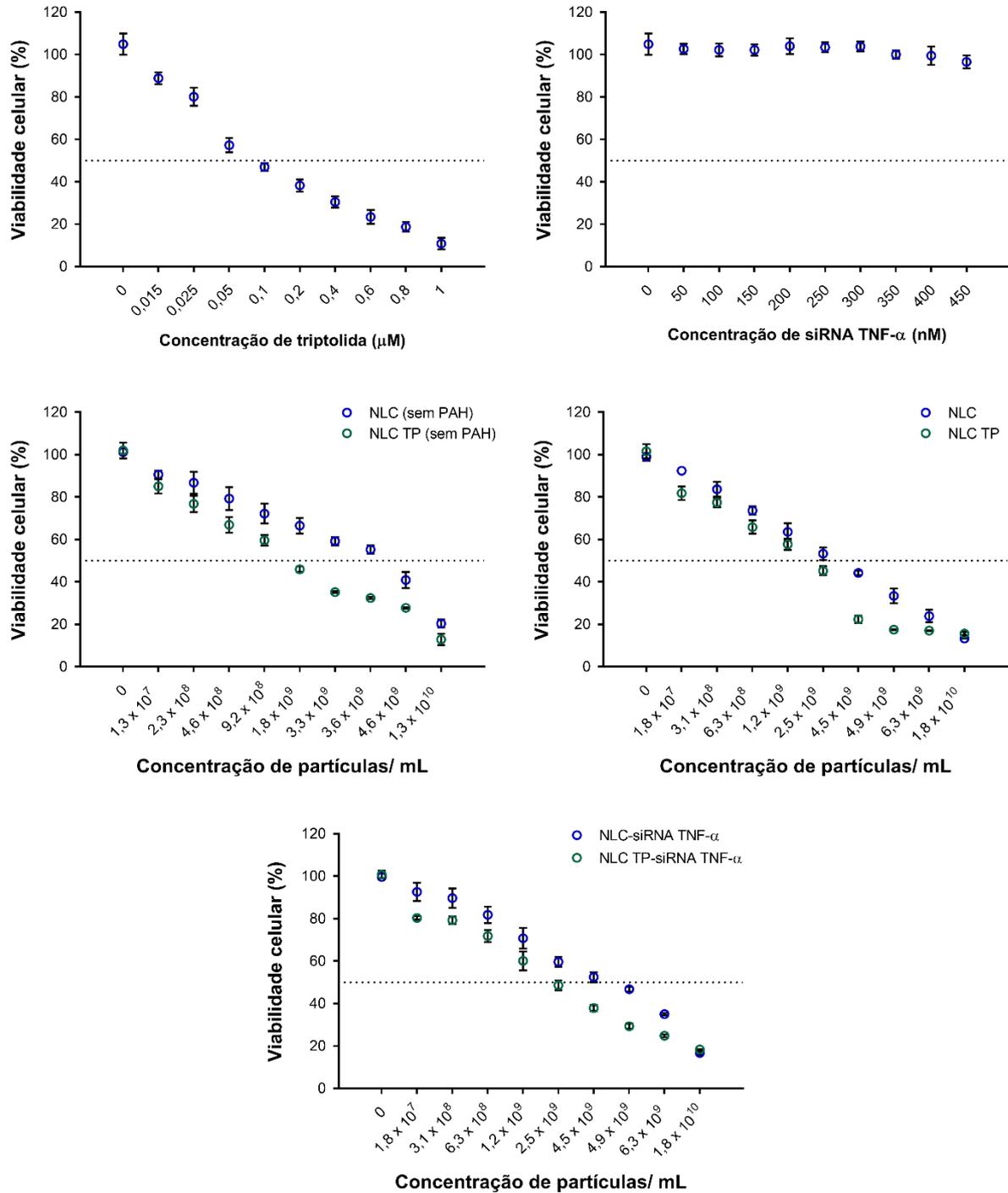
4.2.5. Estudos *in vitro*

4.2.5.1. Viabilidade celular na linhagem HaCaT

O estudo de viabilidade *in vitro* da triptolida e do siRNA TNF- α em suas formas livres e carregados nas NLCs foi realizado pelo ensaio de resazurina em células de queratinócitos humanos normais da linhagem imortalizada HaCaT. Esta linhagem celular foi selecionada para os ensaios por exibir propriedades celulares basais e representar uma das principais células ativas no processo patológico da psoríase (BOCHEŃSKA *et al.*, 2017; CHIRICOZZI *et al.*, 2018).

Os dados de viabilidade obtidos para as diferentes amostras e concentrações utilizadas estão representados na **Figura 28** e os valores de IC₅₀ calculados posteriormente estão apresentados na **Tabela 13**.

Figura 28 - Representação gráfica da viabilidade celular obtidas pelo ensaio de resazurina para a linhagem HaCaT. Porcentagem de viabilidade celular após 24 h de tratamento. Controle negativo: meio de cultura DMEM 10% SBF. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=8).



Fonte: do autor, 2020.

Tabela 13 - Determinação do IC₅₀ para HaCaT após 24 h de tratamento.

<i>Amostra</i>	<i>IC₅₀ Partículas/ mL</i>	<i>IC₅₀ Molaridade TP (µM)</i>	<i>IC₅₀ Molaridade siRNA (nM)</i>
<i>TP livre</i>	n.a.	0,09 ± 0,01	n.a.
<i>siRNA TNF-α livre</i>	n.a.	n.a.	n.d.
<i>NLC sem PAH</i>	3,23 ± 0,09 x 10 ⁹	n.a.	n.a.
<i>NLC TP sem PAH</i>	1,51 ± 0,15 x 10 ⁹	0,26 ± 0,02 #	n.a.
<i>NLC</i>	2,29 ± 0,07 x 10 ⁹	n.a.	n.a.
<i>NLC TP</i>	1,19 ± 0,08 x 10 ⁹	0,26 ± 0,01 *#	n.a.
<i>NLC + siRNA TNF-α</i>	3,19 ± 0,12 x 10 ⁹	n.a.	209,61 ± 10,51
<i>NLC TP + siRNA TNF-α</i>	1,91 ± 0,11 x 10 ⁹	0,34 ± 0,02 #	196,79 ± 11,70

Abreviações: TP = triptolida; NLC = nanodispersão líquido-cristalina; PAH = poli(alilamina hidroclorada); siRNA = *small interfering RNA*; n.a. = não se aplica; n.d. = não determinado.

Os dados são apresentados pela média ± DP (n=8). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey ($p = 0,001$: # = grupos comparados com TP livre; e * = NLC TP comparado com TP livre).

Fonte: do autor, 2020.

A citotoxicidade das amostras analisadas, exceto do siRNA TNF- α livre, mostraram-se dependentes da concentração (**Figura 28**). Não foi possível determinar o IC₅₀ do siRNA TNF- α livre devido a baixa taxa de transfecção celular e à suscetibilidade a degradação enzimática, como bem reportado na literatura (CHU; TANG; YIN, 2015; BOHR *et al.*, 2017; HUANG; GUO; GUI, 2018). Por outro lado, quando carregado pelas NLCs, a concentração do IC₅₀ foi alcançada com aproximadamente 200 nM. Na literatura, é escassa informações sobre o IC₅₀ siRNA TNF- α associado a carreadores. Como exemplo, Bohr *et al.* (2017) obtiveram uma concentração equivalente a 470 nM para o siRNA TNF- α carregado por dendrímeros em células de macrófago murino (linhagem RAW 264.7). Em outro estudo, concentrações de 10, 20, 40 e 100 nM de siRNA TNF- α em lipoplexos não influenciaram significativamente na viabilidade (60-90%) das células endoteliais em 48 h (CONSTANTINESCU *et al.*, 2019). Huang *et al.* (2018) também relataram baixa citotoxicidade do siRNA carregado em nanopartículas poliméricas em concentrações de 0,1 e 0,7 µg/mL, equivalente a 1,3 e 9,3 µM (HUANG; GUO; GUI, 2018).

Para a triptolida em solução, o IC₅₀ foi determinado a uma concentração de 0,09 ± 0,01 µM. Na literatura, a triptolida apresenta uma ampla variação de toxicidade de acordo com o tipo celular e tempo de tratamento. Em linhagens murinas normais, como de queratinócitos e macrófagos, as doses variam de 10 a 200 nM (XI *et al.*, 2017; HOU; LIU; XU, 2019). Para a linhagem HaCaT, Feng *et al.* (2005), Hongqin *et*

al. (2011) e Tian *et al.* (2018) relataram IC₅₀ de 0,01 μM, 2,42 μM e 1 μM, respectivamente. Essa variação de concentrações pode ser decorrente de vários fatores, como a densidade de células utilizadas, o método de análise e o tempo de incubação.

Por outro lado, quando encapsulada nas NLCs é possível observar um aumento de aproximadamente 3 vezes do IC₅₀, indicando que o sistema carreador conferiu proteção às células da toxicidade inerente da triptolida. Adicionalmente, um efeito interessante foi observado quando o siRNA TNF-α foi complexado as NLC TP, onde foi necessária uma maior concentração de NLCs contendo a triptolida (0,34 ± 0,02 μM) para atingir uma concentração inibitória de 50%. De forma semelhante, a presença do siRNA TNF-α também alterou o IC₅₀ das NLCs controles.

Em relação às NLCs desenvolvidas, além dos efeitos da presença da triptolida e do siRNA TNF-α, foi avaliado também a influência do polímero PAH na sua composição. De acordo com os valores de IC₅₀ pode-se observar que a presença do polímero conferiu uma diminuição de 1,2 a 1,4 vezes quando comparado as NLCs sem o polímero. Apesar disso, esse resultado mostrou-se promissor, pois, polímeros catiônicos usualmente conferem elevada citotoxicidade às nanopartículas, por proporcionar uma entrega mais eficiente nas membranas celulares com carga líquida negativa (FANG *et al.*, 2015; RAI; ALWANI; BADEA, 2019). É relatado que, o número de aminas primárias na superfície e, portanto, o caráter catiônico da superfície, é relacionado com a compatibilidade hematológica e baixa citotoxicidade (RAI; ALWANI; BADEA, 2019). Desta forma, correlacionando com os valores de potencial zeta obtidos para as NLCs na presença do PAH podemos inferir que a carga superficial positiva em torno de 11,25 ± 0,07 mV não confere efeitos tóxicos significativos nas células. Ainda, isso fica claro quando o siRNA TNF-α é complexado nas NLCs, e estas apresentam carga superficial de + 5,2 ± 0,84 mV, conseqüentemente, é necessário um maior concentração de partículas para exibir um efeito tóxico (TAKEMOTO; NISHIYAMA, 2017).

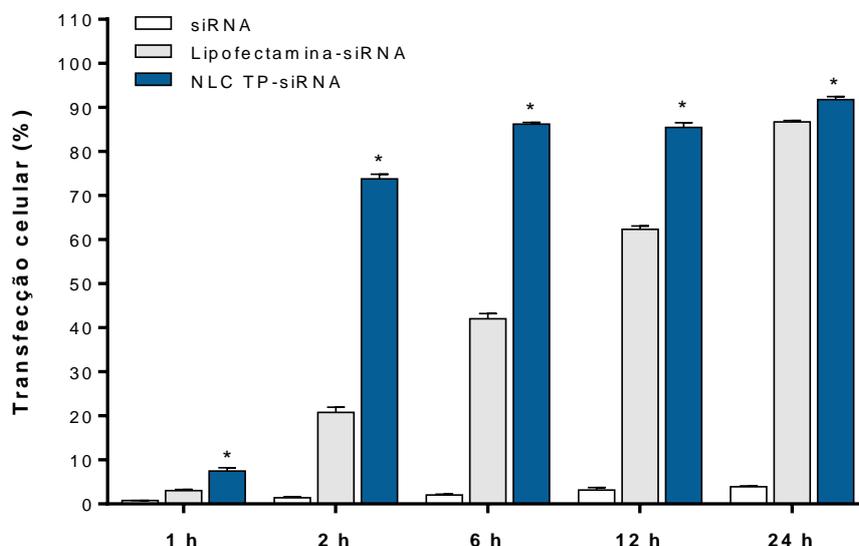
4.2.5.2. Avaliação da internalização celular, vias endocíticas e tráfico intracelular das NLCs

O desenvolvimento de veículos de entrega de medicamentos intracelulares exige um entendimento profundo de sua internalização e função ao entrar na célula para adaptar as características físico-químicas dessas plataformas e obter

tratamentos eficazes (CALDORERA-MOORE *et al.*, 2010). Para a entrega de siRNAs, um grande obstáculo para a sua tradução clínica é encontrar um veículo de entrega adequado e seguro, capaz de ser estável em pH fisiológico e libere o seu conteúdo em pH ácido endossomal, cumprindo a entrega somente no citoplasma (TAKEMOTO; NISHIYAMA, 2017; DONG; SIEGWART; ANDERSON, 2019; PATEL *et al.*, 2019; WOJNILOWICZ *et al.*, 2019).

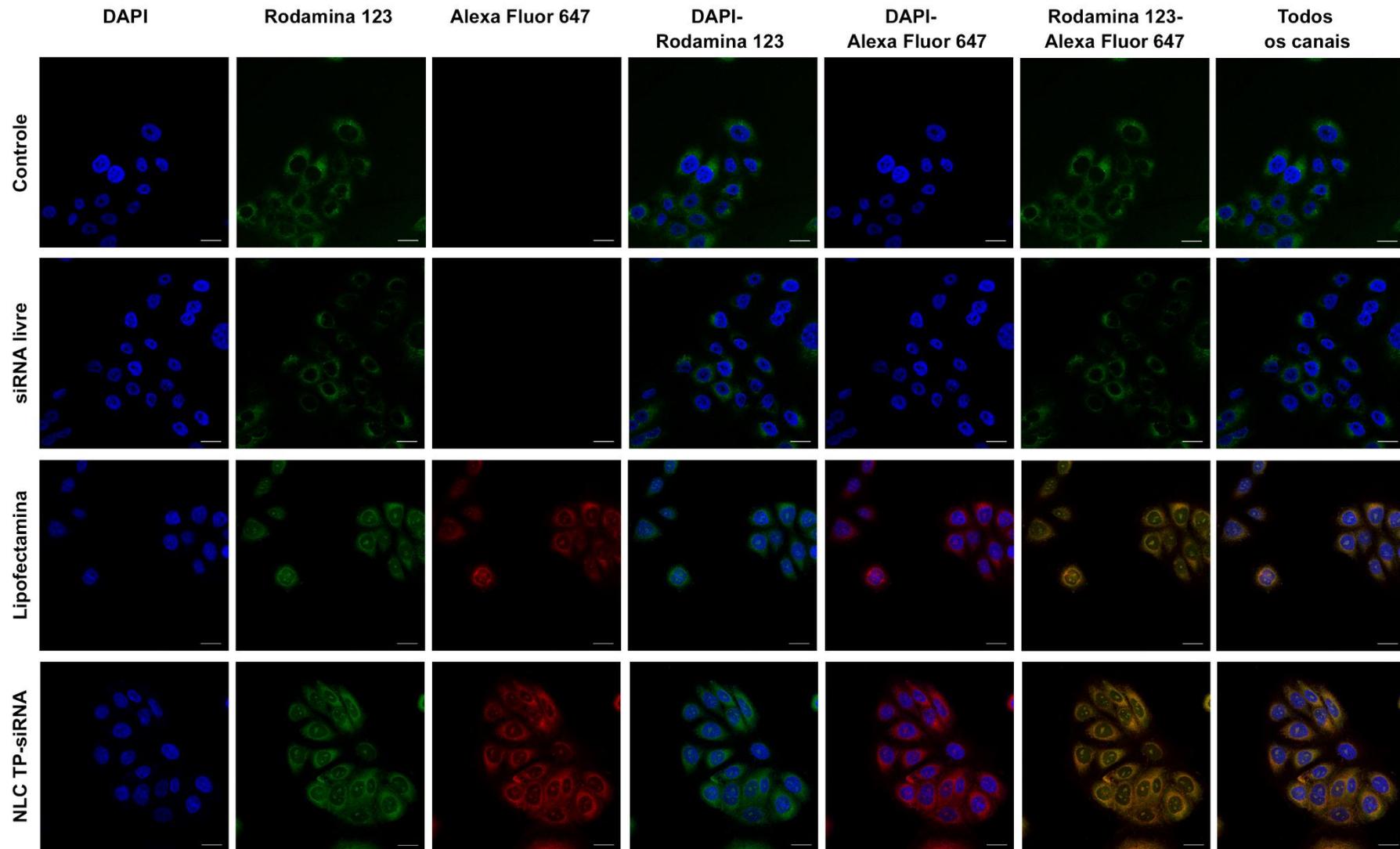
De forma a compreender a capacidade das NLCs em transportar o siRNA nas células, a eficiência de internalização foi avaliada por citometria de fluxo em diferentes tempos de tratamento e, por meio da microscopia confocal de varredura a laser foi possível observar a localização dos complexos NLCs-siRNA nas células após 24 h de tratamento. Os resultados dessas análises estão apresentados na **Figura 29** e **30**.

Figura 29 - Eficiência de internalização celular das NLC TP em HaCaT. Representação gráfica da porcentagem de internalização celular das NLC TP obtidas por citometria de fluxo após os diferentes tempos de tratamento. Controle positivo de transfecção: lipofectamina 2000®-siRNA Alexa Fluor 647. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5). Análise estatística realizada por teste *t* de Student (* $p < 0,0001$: NLC TP-siRNA vs siRNA).



Fonte: do autor, 2020.

Figura 30 - Fotomicroscopias representativas da captação celular das NLCs em HaCaT obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após 24 h de tratamento. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular), Rodamina 123 (λ 552 nm; marcador membrana mitocondrial) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC). Controle positivo de transfecção: lipofectamina 2000®; controle negativo: meio DMEM suplementado com 10% SBF. A barra de escala corresponde a 20 μ m.



Fonte: do autor, 2020.

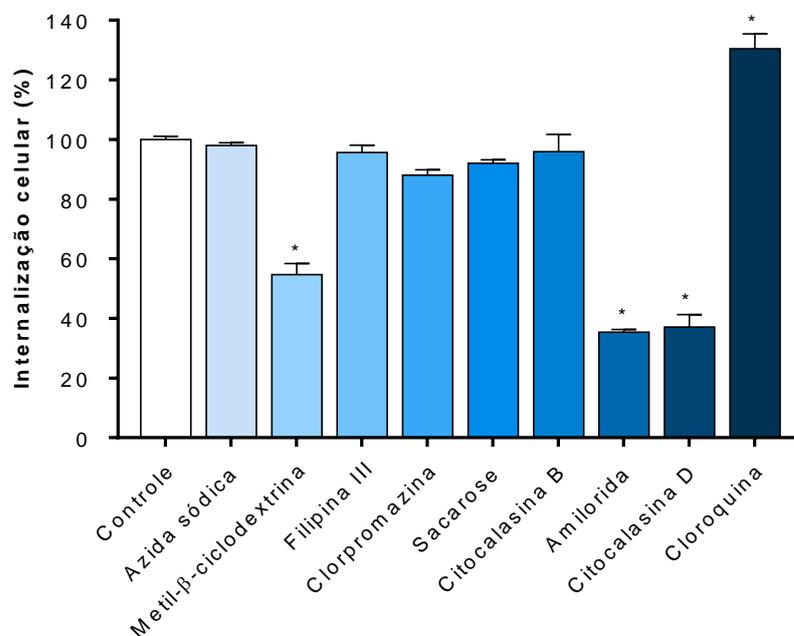
A análise quantitativa da internalização celular das NLCs-siRNA em HaCaT demonstrou que, após um período de incubação relativamente curto (1 h), os níveis de siRNA celular fornecidos pelas NLCs alcançaram quantidades superiores aos controles utilizados. Essa tendência foi observada em todos os tempos, sendo que a partir de 6 h de incubação os níveis foram mantidos em mais de 85 % (**Figura 29**). Os sinais de fluorescência vermelha correspondendo ao siRNA marcado com Alexa Fluor 647 nas imagens de microscopia confocal corroboram os dados obtidos por citometria de fluxo. De acordo com a **Figura 30**, após 24 h de tratamento, as células tratadas com as NLCs apresentaram uma alta intensidade de fluorescência, assim como o controle positivo, ainda que comparativamente podemos observar uma ligeira diminuição dessa intensidade. A fluorescência vermelha é observada por todo o citoplasma e regiões perinucleares (núcleo corado com DAPI – representado pela cor azul). Adicionalmente, a marcação das células com Rodamina 123, é comumente utilizada para predizer alterações mitocondriais, que resultam em perda do corante e consequente diminuição da fluorescência (CHAZOTTE, 2011). Desta forma, a manutenção da sua fluorescência nos sugere que o tratamento com as NLCs não provocou alterações mitocondriais, ou mesmo morfológicas (**Figura 30**).

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com o reportado na literatura. O siRNA livre foi pouco absorvido pelas células HaCaT, o que é consistente com a hipótese de que grandes biomoléculas como o siRNA são dificilmente endocitadas pelas células (YIN *et al.*, 2014), enquanto que, maiores taxas de internalização são alcançadas com a veiculação em carreadores. Além disso, é bem reportado que nanopartículas com maior carga superficial positiva exibem uma afinidade mais forte pela membrana celular carregada negativamente (glicoproteínas da superfície celular) sendo responsável por maior captação celular (ALBANESE; TANG; CHAN, 2012). Em relatórios anteriores do grupo, NLCs de fase hexagonal modificadas com o polímero PEI apresentaram taxas de internalização acima de 80% em um período de incubação de 24 h (DEPIERI *et al.*, 2016; PETRILLI *et al.*, 2016; TOFANI *et al.*, 2018). No entanto, a carga superficial positiva das NLCs do presente estudo foi fornecida pelo polímero PAH, e corroborando com dados da literatura, nanopartículas produzidas com este polímero confirmam a elevada capacidade de promover internalização celular, além de efeitos aprimorados no silenciamento gênico e entrega de moléculas bioativas. Zhao *et al.* (2012) reportaram que nanopartículas de ouro com superfície modificada por PAH ou PEI exibiram eficiências de internalização equivalentes, além disso,

ensaios de atividade revelaram que o siRNA entregue pelas nanopartículas contendo PAH forneceram um efeito silenciador aprimorado em comparação com o controle de transfecção, lipofectamina 2000® (ZHAO *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2015) também demonstraram boa biocompatibilidade e internalização de nanoplexos de pontos quânticos-siRNA contendo PAH comparado aos produzidos com PEI (WANG *et al.*, 2015b).

Para explorar o mecanismo que mediou à internalização das NLCs, as células foram pré-tratadas com inibidores de endocitose mediada por clatrina (sacarose 0,5 M e clorpromazina 2,5 μ M), endocitose mediada por caveolina (Metil- β -ciclodextrina 1 μ M e filipina III 50 μ M), macropinocitose (amilorida 0,1 mM e citocalasina D 30 μ M), fagocitose (citocalasina B 1 μ M) e metabolismo celular (azida sódica 50 mM). Adicionalmente, avaliou-se os efeitos da inibição da acidificação lisossomal com cloroquina (25 μ M). Previamente, ensaios de citotoxicidade foram realizados em células HaCaT, de modo a assegurar que as concentrações utilizadas não afetariam a viabilidade celular durante as investigações de inibição. Além disso, junto as análises de citometria de fluxo, a viabilidade celular foi verificada com iodeto de propídeo, que se manteve em níveis próximos ou iguais a 100%. As porcentagens de internalização das NLCs na presença individual dos inibidores estão apresentadas na **Figura 31**.

Figura 31 - Internalização celular das NLCs na presença de diferentes inibidores de endocitose. Representação gráfica da porcentagem da internalização celular após 6h de tratamento com as NLCs na ausência (controle positivo) e na presença dos inibidores de endocitose. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3). Análise estatística realizada por teste *t* de Student (* $p < 0,001$ em relação ao controle positivo).



Fonte: do autor, 2020.

A internalização das NLCs foi notavelmente inibida pela amilorida ($64,59 \pm 0,89$ %) e citocalasina D ($62,92 \pm 4,22$ %), inibidores da bomba de sódio/prótons e despolarização da F-actina, respectivamente, sugerindo um mecanismo de captação mediado por macropinocitose. A internalização suprimida na presença de metil-β-ciclodextrina ($45,32 \pm 3,70$ %) indica a participação das caevolinas, mais especificamente, pela participação das flotilinas, proteína integrais de membrana residentes de cavéola (EL-SAYED; HARASHIMA, 2013). O envolvimento desta classe de proteínas pode ser sugerido devido à ausência de efeitos observados com o pré-tratamento com filipina III, o qual é utilizado para bloquear a endocitose mediada por caveolinas pelo sequestro de colesterol (EL-SAYED; HARASHIMA, 2013; RADAIC *et al.*, 2016; SELBY *et al.*, 2017).

Comparativamente, a clorpromazina e sacarose hipertônica exerceram efeitos mínimos sobre a internalização das NLCs, excluindo o envolvimento da via dependente de clatrina. O envolvimento de outras vias também foi descartado com os efeitos mínimos da inibição do metabolismo celular pela azida sódica, e por fagocitose pela citocalasina B.

Posteriormente, o pré-tratamento com cloroquina, um inibidor da acidificação lisossomal, aumentou a carga de NLC-siRNA intracelular em $30,4 \pm 5,05$ % em relação ao controle. Isso sugere que, neste tempo de análise, uma fração de NLCs ainda permanece nos compartimentos endo-lisossomais, e as alterações na acidificação facilitam seu escape. O uso de cloroquina e seus derivados foi bem documentado como uma estratégia para facilitar o escape endossomal de ácidos nucleicos mediante neutralização dos prótons e eventualmente um aumento do volume osmótico, levando ao rompimento do compartimento, assim, alcançando um aumento do silenciamento gênico (DURYMANOV; REINEKE, 2018; NELEMANS; GUREVICH, 2020). De acordo com Cheng e colegas (2006), há pelo menos três características mecanicistas da cloroquina que levam ao aprimoramento da internalização e da expressão gênica: (i) tamponamento nas vesículas endocíticas, (ii) deslocamento de polímeros dos ácidos nucleicos nos políplexos e (iii) alteração das propriedades biofísicas do ácido nucleico liberado (CHENG *et al.*, 2006).

Nos últimos anos as vias endocíticas foram identificadas para uma variedade de outras nanopartículas não virais e, em muitos casos, os estudos demonstraram o envolvimento de múltiplas vias endocíticas (DONAHUE; ACAR; WILHELM, 2019; NELEMANS; GUREVICH, 2020). Diversos fatores podem estar relacionados com os mecanismos de internalização, como o tamanho, rigidez, carga superficial, forma e composição química dos materiais (ZHAO; STENZEL, 2018; DONAHUE; ACAR; WILHELM, 2019). O tipo de célula em estudo também pode influenciar ativamente nos mecanismos de internalização (CANTON; BATTAGLIA, 2012).

Apesar disso, a macropinocitose é uma das vias predominantemente associada a internalização de nanopartículas modificadas com PAH (WANG *et al.*, 2012; HAN; TANG; YIN, 2015; ANDREOZZI *et al.*, 2017). Enquanto que, para NLCs, mecanismos dependentes de energia e dependentes de colesterol têm sido sugeridos, variando de acordo com a carga residual, estrutura líquido-cristalina ou modificações na superfície (XU *et al.*, 2014; MURGIA *et al.*, 2015; ABDEL-BAR; EL BASSET SANAD, 2017; DESHPANDE; SINGH, 2017). Além disso, o mosaico de regiões com diferentes graus de hidrofobicidade da membrana celular se correlaciona com a superfície dos NLCs, permitindo a interação e internalização celular por diferentes mecanismos (DESHPANDE; SINGH, 2017). Ainda, outros estudos com cultura celular e com bicamadas lipídicas suportadas têm demonstrado que NLCs com diferentes componentes lipídicos pode apresentar mecanismos de fusão com a membrana

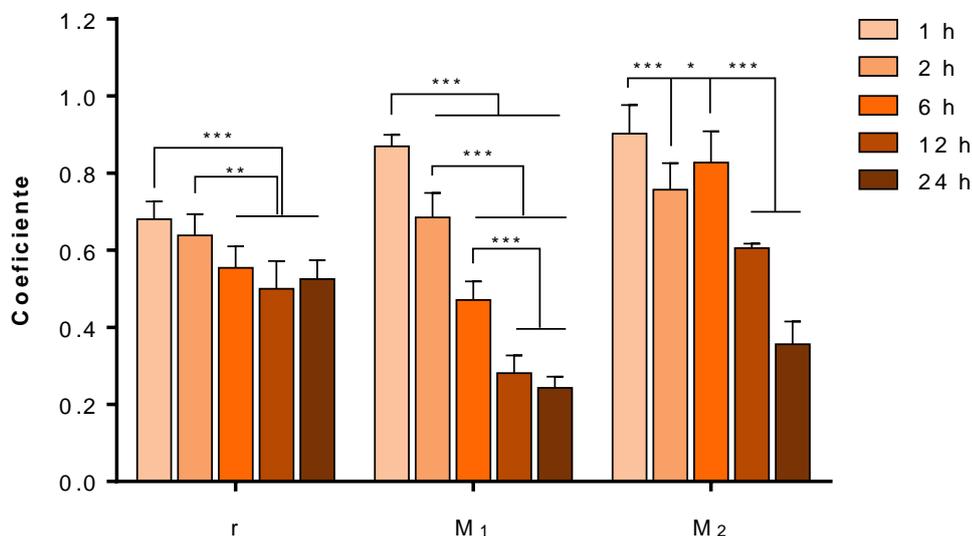
celular, favorecendo a sua internalização (DYETT *et al.*, 2019; STRACHAN *et al.*, 2020; JABLONOWSKA *et al.*, 2021).

Após a captação celular, os endossomos são compartimentos celulares nos quais as nanopartículas estão localizadas após a fusão das grandes vesículas (RIVOLTA; PANARITI; MISEROCCHI, 2012; PATEL *et al.*, 2019). O material internalizado pode ser então, reciclado para a membrana ou transportado para endossomas tardios, endolisossomos e finalmente lisossomos, contando com a ativação dinâmica de microtúbulos e filamentos de actina (RIVOLTA; PANARITI; MISEROCCHI, 2012; SELBY *et al.*, 2017). Durante este processo, os vetores de entrega de siRNA devem facilitar o escape endo/lisossomal e liberar os siRNAs no citosol para que o efeito de silenciamento ocorra (TAKEMOTO; NISHIYAMA, 2017). Este evento pode ocorrer por desestabilização da membrana, alterações na pressão osmótica ou ainda pelo inchaço das nanoestruturas e ruptura do compartimento (PATEL *et al.*, 2019).

Para investigar *in vitro*, se as NLCs-siRNA são capazes de escapar dos endo/lisossomas após serem internalizadas, as células HaCaT tratadas com NLCs-siRNA Alexa Fluor 647 por 1, 2, 6, 12 e 24 h foram coradas com o LysoTracker Green DND26 para identificar endossomos e lisossomos secundários, e DAPI para identificar o núcleo celular antes de serem examinadas sob um microscópio confocal.

A co-localização de cada fluoróforo, Alexa Fluor 647 e LysoTracker Green DND26, nas imagens de fluorescência foram comparadas utilizando a ferramenta JACoP do *software ImageJ*, e o coeficiente de Pearson e coeficientes de Mander (M_1 e M_2) foram calculados. O coeficiente M_1 representa a fração de pixels que contém a fluorescência do siRNA sobreposta com a fluorescência do endo-/lisossomas, e inversamente, o coeficiente M_2 representa a fração de pixels que contém a fluorescência do endo-/lisossomas sobreposta com a fluorescência do siRNA. Os valores encontrados para cada coeficiente são apresentados na **Figura 32**. Adicionalmente, as fotomicroscopias representativas de cada tempo de tratamento são apresentadas na **Figura 33**.

Figura 32 - Coeficiente de Pearson (r) e coeficientes de Mander (M₁ e M₂) para os diferentes tempos de tratamento. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=5 campos para cada réplica independente [n=3]). Análise estatística realizada por Two-way ANOVA, pós teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$; e*** $p < 0,0001$).



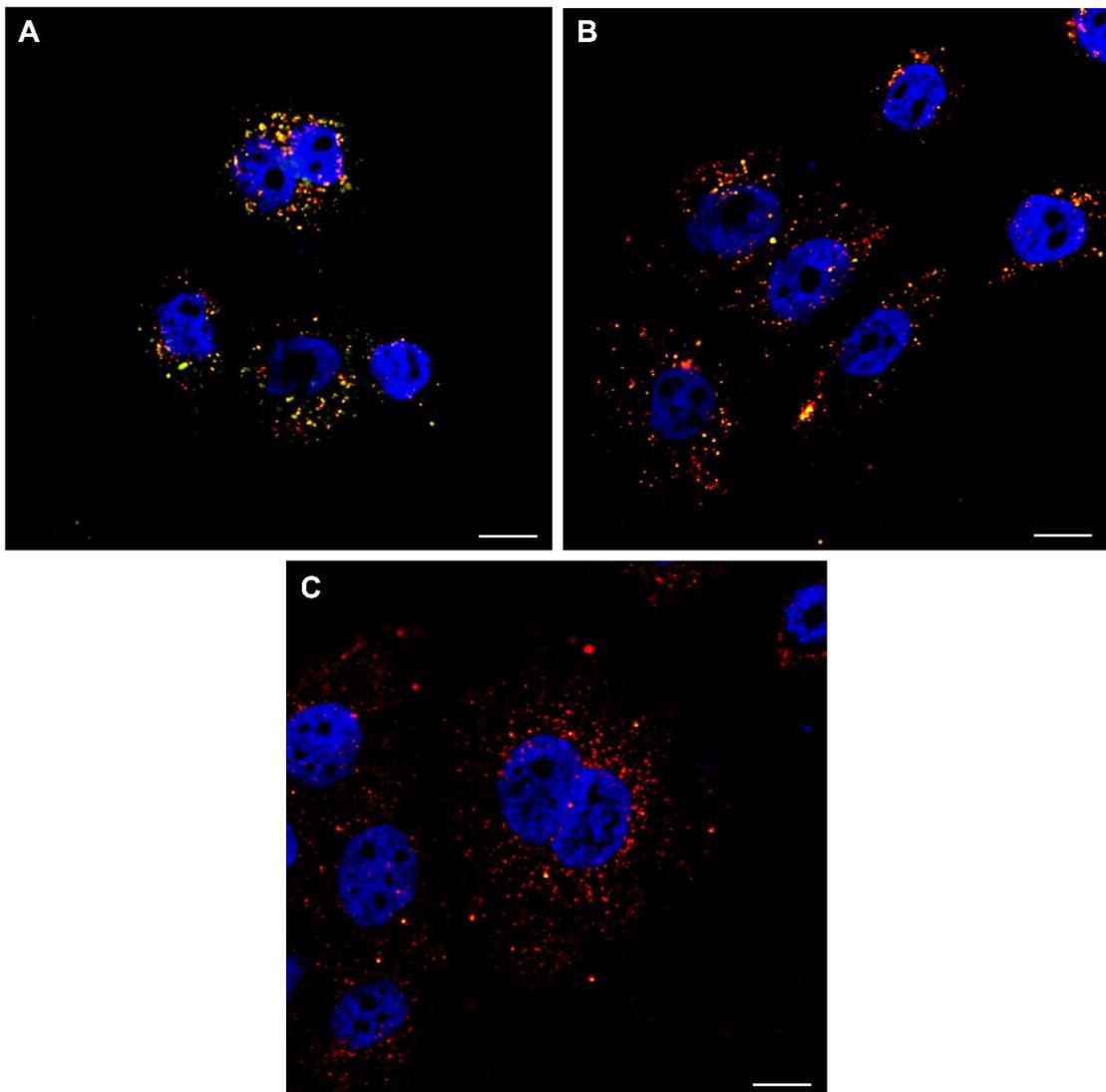
Fonte: do autor, 2020.

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar uma maior correlação entre 1 e 2 h a partir dos maiores valores do coeficiente de Pearson ($r = 0,68 \pm 0,04$ e $0,638 \pm 0,05$), e nos subsequentes tempos, houve uma diminuição dos valores, indicando uma baixa correlação entre as localizações dos fluoróforos, sugerindo uma capacidade de fuga endo-lisossomal das NLCs-siRNA ao longo do tempo. Complementando esses dados, é possível observar na sequência de fotomicroscopias obtidas (**Figura 33**), o aparecimento de sinais de fluorescência laranja a amarelo no citoplasma dentro de 1, 2 e 6 h de incubação, indicando a presença de NLCs-siRNA no compartimento endossômico. À medida que o tempo de incubação foi aumentado (para 12 h e 24 h), mais fluorescência vermelha isolada foi observada em torno do núcleo, indicando a fuga das NLCs-siRNA dos endo/lisossomos.

Para os coeficientes de Mander, M₁ indicou que entre 1 e 2 h havia alta correlação ($0,869 \pm 0,03$ e $0,685 \pm 0,06$) entre os pixels analisados da fluorescência do siRNA Alexa Fluor 647 nos pixels do LysoTracker Green DND26, indicando a co-localização das NLCs-siRNA nos compartimentos ácidos. A partir de 6 h essa correlação diminuiu significativamente. Em contraste, M₂, que relaciona os pixels do LysoTracker Green DND26 co-localizados com os pixels do siRNA Alexa Fluor 647, apresentaram valores variáveis conforme os tempos, mas o decréscimo observado

entre 12 e 24 h indica a baixa co-localização. Em conjunto, esses dados sugerem a fuga endo-lisossomal dos complexos NLCs-siRNA para o citosol.

Figura 33 - Fotomicroscopias representativas do tráfico intracelular das NLCs em HaCaT obtidas por microscopia confocal de varredura a laser após os diferentes tempos de tratamento. Células tratadas com NLCs-siRNA Alexa Fluor 647 por **[A]** 1 h; **[B]** 6 h e **[C]** 24 h. Imagens adquiridas utilizando objetiva de imersão 63x e filtros DAPI (λ 450 nm; marcador de núcleo celular), LysoTracker Green (λ 511 nm; marcador endossomos/lisossomos) e Alexa Fluor 647 (λ 638 nm; marcador de siRNA/NLC). A barra de escala corresponde a 20 μ m.



Fonte: do autor, 2020.

Essa habilidade de escape endo-lisossomal é conhecida pela capacidade de poliaminas em gerar uma diferença osmótica dentro dos endossomos, e o inchaço resultante pode levar à ruptura do endossoma, e conseqüentemente, a carga

complexada nas poliaminas é transferida para o citoplasma (SINGHA; NAMGUNG; KIM, 2011). Andreozzi *et al.* (2017) demonstraram em seus estudos que nanocarreadores formados a partir de uma solução de fosfato de sódio e PAH foram capazes de complexar o siRNA e transportá-lo até o citoplasma e liberá-lo em pH ácido (endossomal). A capacidade de resposta ao pH mostrou que os nanocarreadores com esse polímero são estáveis em intervalos de pH entre 7 a 9, e que desmontam em valores maiores que 9 e menores que 6 (ANDREOZZI *et al.*, 2017).

De forma semelhante, nanopartículas formadas pela complexação de PAH e siRNA mostraram ser estáveis em pH fisiológico, mas desmontam em pH ácido. Além disso, os autores demonstraram que após a captação celular os tempos de difusão do siRNA diminuem, indicando que a acidez endossômica/lisossômica desencadeou a reversão de carga do PAH, induzindo assim a desmontagem dos complexos e sua fuga para o citosol (DI SILVIO *et al.*, 2019). Outros autores também mostraram que sistemas fabricados com PAH são capazes de liberar o siRNA e outros fármacos de forma pH dependente (GUO *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2012; HAN; TANG; YIN, 2015; ZHOU, T.; ZHOU; XING, 2014).

Além dessas considerações sobre a capacidade do PAH em responder ao ambiente ácido e auxiliar no escape endossomal, em uma série de relatórios de Leal *et al.* (2010; 2011 e 2015) demonstraram que a estrutura líquido-cristalina desempenha um papel fundamental na entrega e eficiência de silenciamento gênico por siRNA. Nestes estudos, os dados obtidos com NLCs de fase cúbica bicontínua giroide produzidas com monoleína, monoleína PEGuilada e DOTAP demonstraram que, considerando a teoria da elasticidade de membrana de Helfrich, as NLCs apresentam propriedades fusogênicas eficientes independente da densidade de carga da membrana, mas que, os lipídeos formadores de fase líquido-cristalina reduzem o custo de energia livre de fusão, e assim há concomitante formação de poros entre as membranas da partícula e do compartimento endossomal (LEAL *et al.*, 2010, 2011; KIM; LEAL, 2015). Em outro estudo, Zhen *et al.* (2012) observaram uma tendência geral em aumentar a eficiência do silenciamento gênico (associado ao escape endossomal) com a diminuição da concentração do lipídeo catiônico, DOTAP, em NLCs de fase hexagonal. Os autores também sustentam a teoria que as NLCs, seja de fase cúbica ou hexagonal, apresentam capacidades fusogênicas baseadas na

interação com a membrana endossômica, com transições de fase intracelulares com posterior formação de poros (ZHEN *et al.*, 2012).

Esses achados, em conjunto com a boa citocompatibilidade e as altas taxas de internalização, apontam manifestamente que as NLCs desenvolvidas neste trabalho constituem um sistema promissor para a administração tópica de siRNA e triptolida. Além disso, a escolha do PAH como agente catiônico demonstrou resultados interessantes, devido a sua capacidade de fornecer ácidos nucleicos e fármacos no citosol das células, além de facilitar o escape endossomal das NLCs, considerando que, uma carga positiva é requerida para sistemas carreadores para interagir eletrostaticamente o siRNA, e um certo limite de densidade de carga da membrana foi identificado como um requisito para garantir um escape endossomal eficiente (LIN *et al.*, 2003).

4.2.5.3. Eficácia terapêutica *in vitro*

Em vista dos resultados obtidos com o desenvolvido farmacotécnico das NLCs, o perfil de citocompatibilidade e o notável potencial de entrega de siRNA e triptolida, investigações sobre a eficácia terapêutica *in vitro* foram realizadas em células induzidas com LPS, de modo a mimetizar o estado inflamatório presente na psoríase.

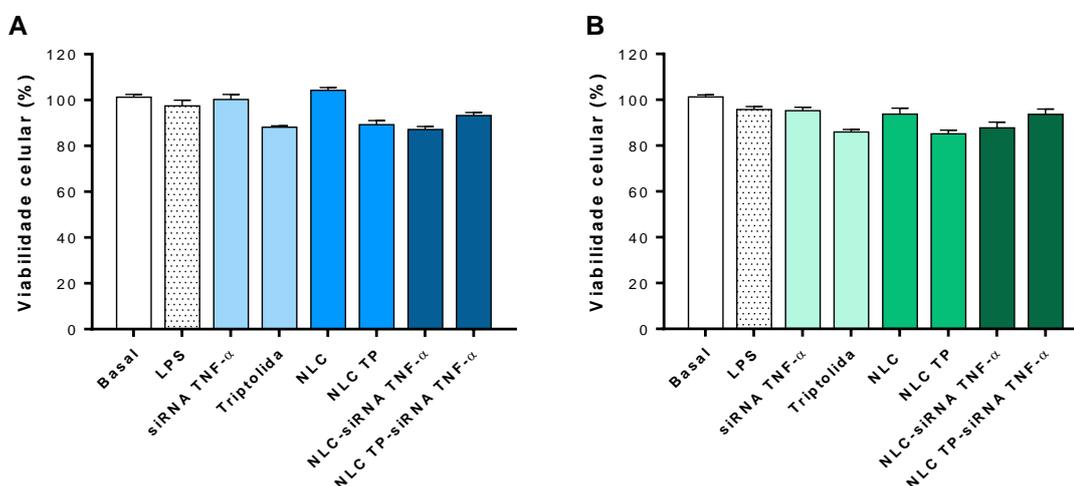
Os monócitos/macrófagos são células que respondem prontamente e eficientemente a endotoxina bacteriana, o LPS. A ligação com o receptor TLR4 (polarização dos macrófagos para um fenótipo inflamatório, M1), recruta os transdutores de sinais JAK 1/2 e uma série de fatores a jusante, resultando na ativação de STAT1 e NF- κ B, e assim, induz a transcrição de inúmeros genes inflamatórios e consequente produção dos mediadores (principalmente, TNF- α , IL-6, IL-1 β e transcrição de enzima óxido nítrico sintase indutível [iNOS]). Em contrapartida, a polarização para macrófagos M2 (fenótipo anti-inflamatório) estimula vias JAK1/3-STAT3 e STAT-6 para produção de mediadores anti-inflamatórios (p.e., IL-10, IL-4 e IL-13), como mecanismo compensatório para o hospedeiro atenuar a inflamação excessiva (MAITRA *et al.*, 2012; ORECCHIONI *et al.*, 2019).

Além dessa resposta ao LPS, os macrófagos são células que também estão presentes na psoríase e participam extensivamente das manifestações patológicas desta doença (YADAV; SINGH; SINGH, 2018). Evidências apoiam que o recrutamento e a ativação de macrófagos em lesões de pele psoriáticas é um fator patogênico chave

para a inflamação cutânea e vascular não controlada (CLARK, 2006; LIN *et al.*, 2018b).

Para este estudo as concentrações das formulações utilizadas foram àquelas que mantiveram a viabilidade celular acima de 80 % obtidas anteriormente com a linhagem de queratinócitos. Além disso, de forma a garantir a viabilidade dos monócitos expostos ao LPS e as formulações, a viabilidade também foi determinada, como apresentado na **Figura 34**.

Figura 34 - Viabilidade celular da cultura de monócitos/ macrófagos primários humanos submetidos à exposição com LPS e aos tratamentos. [A] LPS e tratamentos concomitantes por 48 h. [B] LPS por 24 h iniciais e tratamentos por mais 24 h. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes).

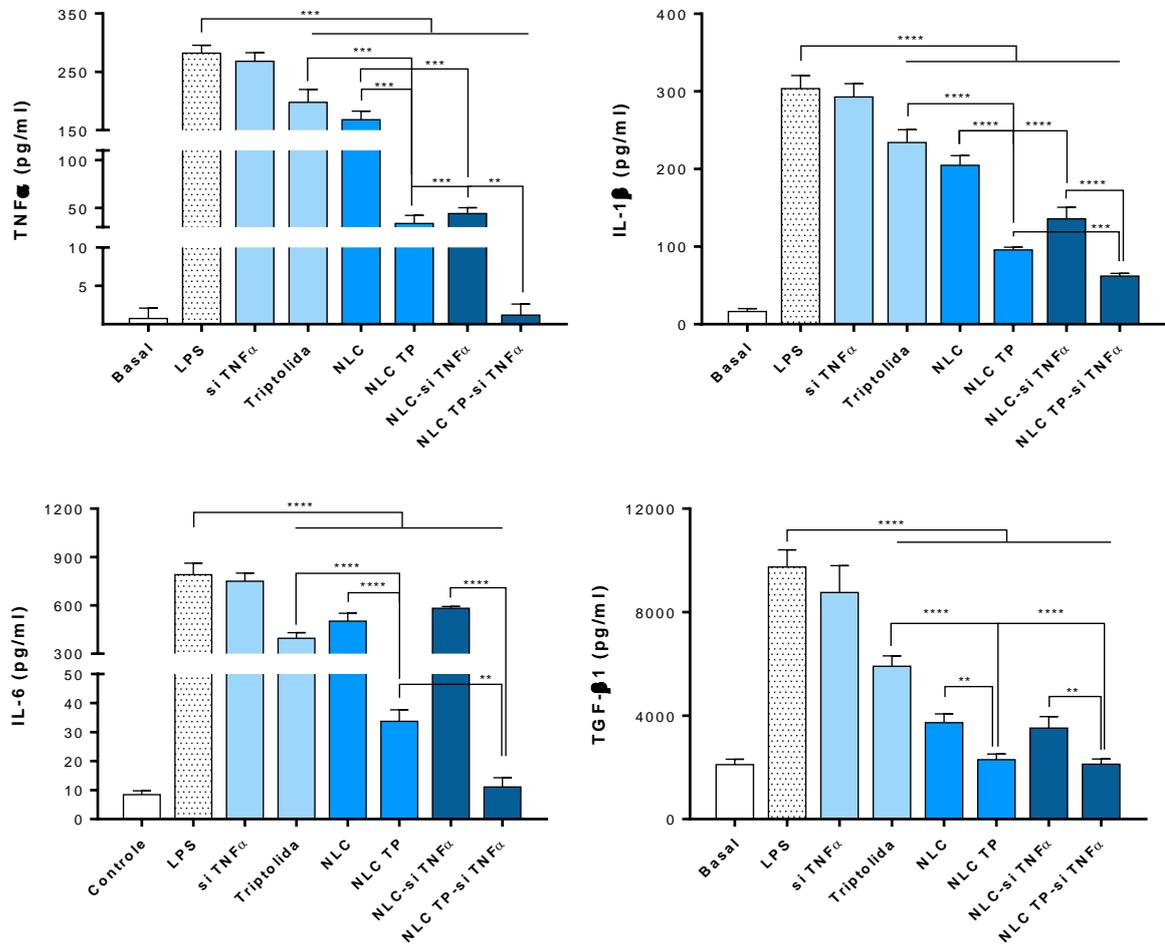


Fonte: do autor, 2020.

As células mostraram-se viáveis durante o período e protocolos experimentais propostos. A incubação concomitante de LPS com as amostras durante 48 h (**Figura 34 A**), bem como, com a pré-incubação do LPS por 24 h, seguida das amostras por mais 24 h (**Figura 34 B**), resultaram em uma viabilidade de 85 a 100%. Estes dados confirmam que as amostras nas concentrações utilizadas não ofereceram toxicidade às células.

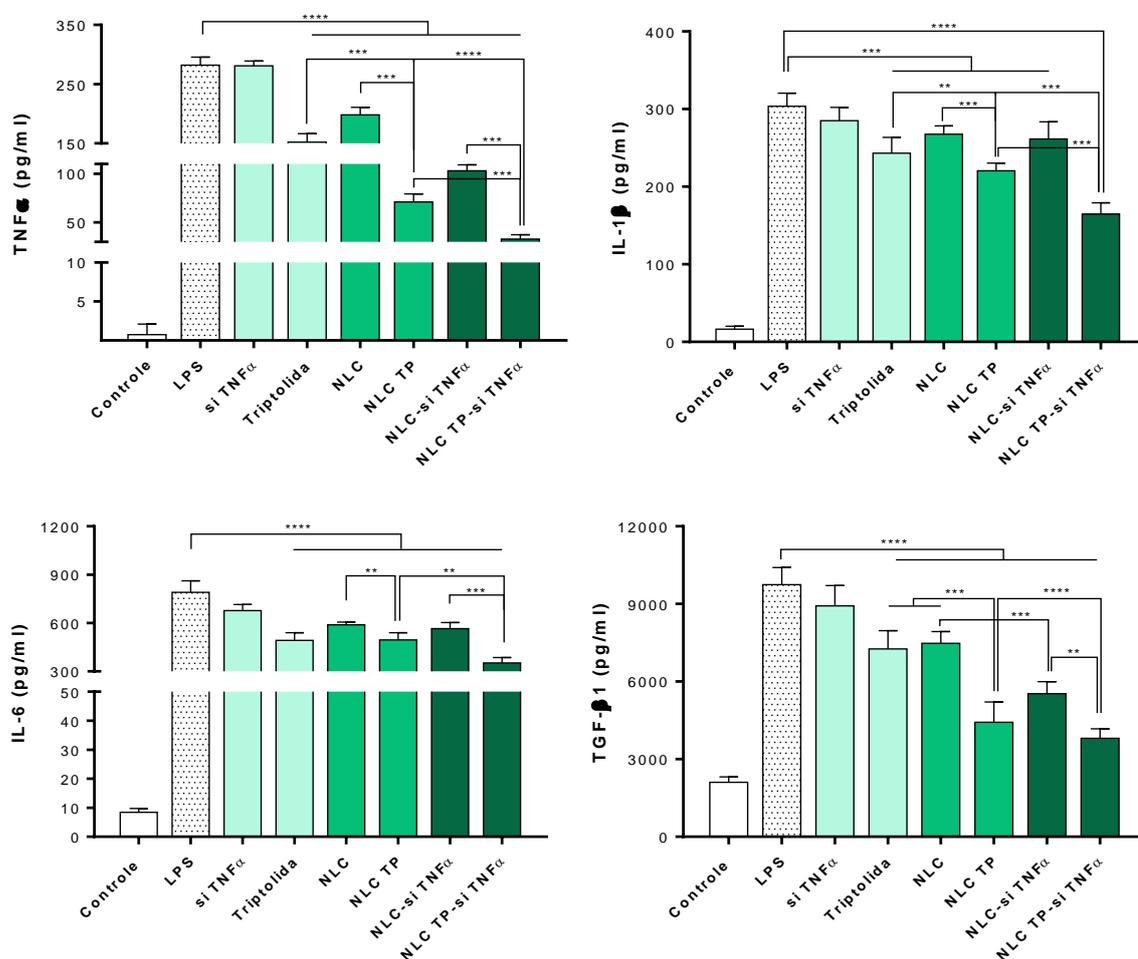
Posteriormente, a eficácia terapêutica das NLCs multifuncionais foi investigada pela quantificação de citocinas (TNF- α ; IL-1 β ; IL-6 e TGF- β) produzidas pelas células após exposição ao LPS e aos tratamentos. Os resultados obtidos para o primeiro protocolo experimental estão apresentados na **Figura 35**, e para o segundo protocolo experimental, na **Figura 36**.

Figura 35- Perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos/macrófagos primários humanos submetidos à exposição concomitante de LPS e tratamentos por 48 h. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$).



Fonte: do autor, 2020.

Figura 36 - Perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos/macrófagos primários humanos submetidos à exposição inicial com LPS por 24 h, seguido dos tratamentos por 24 h. Os dados são apresentados pela média \pm DP (n=3 ensaios independentes). Análise estatística realizada por One-way ANOVA, pós teste de Tukey (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$).



Fonte: do autor, 2020.

De acordo com **Figura 35**, a exposição das células ao LPS induziu a produção de elevados níveis de todas as citocinas analisadas em comparação ao controle basal. Nitidamente, a co-entrega da triptolida e siRNA TNF- α pelas NLCs resultou em uma diminuição significativa na secreção de TNF- α ($282,1 \pm 13,4$ pg/mL vs $1,7 \pm 0,4$ pg/mL), IL-6 ($801,3 \pm 70,1$ pg/mL vs $11,8 \pm 3,2$ pg/mL), IL-1 β ($304,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $63,2 \pm 3,5$ pg/mL) e TGF- β 1 ($9425,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $2132,5 \pm 195,7$ pg/mL) das células estimuladas com LPS. O IC calculado para TNF- α e IL-6 foi de 0,033 e 0,364, respectivamente, indicando um sinergismo forte na inibição dessas citocinas pela

combinação dos dois agentes terapêuticos; para IL-1 β e TGF- β 1, o IC foi de 1,09 e 1,1, respectivamente, indicando um efeito aditivo.

Os tratamentos com os controles mostraram que, o siRNA TNF- α possui efeito silenciador sobre TNF- α e outras citocinas apenas quando veiculado pelas NLCs. Para TNF- α , o efeito silenciador resultou em diminuição de 6,8 vezes em relação ao controle-LPS ($282,1 \pm 13,4$ pg/mL vs $41,5 \pm 6,2$ pg/mL). Para IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1 a redução dos níveis foram de 2,27 ($304,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $133,9 \pm 14,8$ pg/mL); 1,69 ($801,3 \pm 70,1$ pg/mL vs $473,8 \pm 28,7$ pg/mL) e 2,76 vezes ($9425,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $3412,5 \pm 449,6$ pg/mL), respectivamente.

A triptolida, por sua vez, apresenta um efeito anti-inflamatório marcante ao inibir a secreção de TNF- α ($282,1 \pm 13,4$ pg/mL vs $192,3 \pm 22,1$ pg/mL), IL-6 ($801,3 \pm 70,1$ pg/mL vs $395,8 \pm 34,3$ pg/mL), IL-1 β ($304,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $236,3 \pm 16,5$ pg/mL) e TGF- β 1 ($9425,0 \pm 16,8$ pg/mL vs $5915,0 \pm 398,52$ pg/mL). No entanto, quando encapsulada nas NLCs, este efeito mostrou-se mais pronunciado, reduzindo os níveis de TNF- α em 5,8 vezes ($p < 0,0001$), 11,75 vezes para IL-6 ($p < 0,01$), 2,44 vezes para IL-1 β ($p < 0,0001$) e 2,57 vezes para TGF- β 1 ($p < 0,0001$) comparado com a triptolida livre.

Curiosamente, as NLCs (sem triptolida ou siRNA TNF- α) mostraram, em níveis menos expressivos, modular a secreção das citocinas estimuladas pelo LPS. Os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1 foram reduzidos em 1,64; 1,49; 1,37 e 2,53 vezes, respectivamente. Este efeito pode ser atribuído ao seu conteúdo lipídico, principalmente, pela presença do ácido oleico.

No segundo protocolo experimental, avaliamos se as NLCs multifuncionais seriam capazes de atenuar a secreção das citocinas produzidas pelas células previamente estimuladas com o LPS. Como mostrado na **Figura 36** o tratamento com as NLC TP-siRNA TNF- α inibiu significativamente a secreção das citocinas ($p < 0,0001$). Um efeito expressivo foi observado para TNF- α , com uma diminuição de 8,5 vezes em relação ao controle-LPS ($285,2 \pm 13,4$ pg/mL vs $33,8 \pm 4,2$ pg/mL), 2,15 vezes em relação às NLC TP ($72,4 \pm 8,1$ pg/mL vs $33,8 \pm 4,2$ pg/mL) e 5,99 vezes em relação à triptolida livre ($151,9 \pm 14,3$ pg/mL vs $33,8 \pm 4,2$ pg/mL). O CI de 0,7 indicou um sinergismo moderado para o tratamento nesta condição experimental.

Em relação a IL-6, os níveis foram diminuídos para todos os tratamentos, mas não houve diferença estatística entre a TP livre e as NLCs-TP. No entanto, o tratamento com as NLCs multifuncionais mostrou diminuir a produção de IL-6 em

comparação aos outros tratamentos ($p < 0,01$ e $0,001$) e ao controle-LPS ($p < 0,0001$). Apesar dos efeitos menos pronunciados, o IC calculado indicou um efeito aditivo (IC = 1,1). De forma semelhante, para IL-1 β e TGF- β 1 o tratamento multifuncional mostrou uma diminuição significativa dos níveis em relação aos outros tratamentos ($p < 0,001$) e ao controle-LPS ($p < 0,0001$). O IC calculado também indicou um efeito aditivo (IC = 1,1) para ambos.

Neste protocolo experimental, da mesma forma que anteriormente, os efeitos terapêuticos do siRNA TNF- α foram observados quando veiculado pelas NLCs. A redução dos níveis de TNF- α foram de 2,7 vezes em relação ao controle-LPS. Para as outras citocinas a redução dos níveis variou de 1,1 a 1,8 vezes. As NLCs também exibiram algum efeito sobre a produção/liberação das citocinas nesta condição experimental. Os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1 foram reduzidos em 1,43; 1,14; 1,36 e 1,42 vezes, respectivamente.

De acordo com os resultados apresentados, é notável a capacidade antiinflamatória e imunomoduladora da triptolida, principalmente quando encapsulada nas NLCs. Além disso, a co-entrega de siRNA TNF- α pelas NLC TP mostrou ser uma estratégia eficiente para melhorar a regulação específica de TNF- α e outras citocinas envolvidas na cascata imunológica da psoríase. Os efeitos da triptolida sobre o sistema imunológico é atribuído à regulação das vias de sinalização NF- κ B, JNK/MAPK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase/ mitogen-activated protein kinase*) e receptores TLRs (CHEN *et al.*, 2018; TASNEEM *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2019). Curiosamente, Premkumar *et al.* (2010) reportaram a capacidade da triptolida em atenuar a ativação e sinalização de TLR4 em macrófagos estimulados com LPS a partir da inibição de moléculas receptoras e adaptadoras (MyD88 e TRIF), resultando em regulação negativa de ciclooxigenase-2 e iNOS (PREMKUMAR *et al.*, 2010). Em outros estudos, a triptolida mostrou reduzir a produção de uma série de citocinas e quimiocinas inflamatórias, moléculas co-estimuladoras, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em monócitos/macrófagos, células T e CDs, reforçando o grande potencial terapêutico da molécula em doenças inflamatórias e auto-imunes (YUAN *et al.*, 2019).

Em nossos estudos, as NLCs como plataforma para entrega de triptolida mostrou atenuar os efeitos tóxicos da molécula, como anteriormente demonstrado pelos ensaios de viabilidade celular, e permitiu um melhor desempenho farmacológico, considerando a redução dos níveis de citocinas determinados frente à

exposição com LPS. Além disso, vale ressaltar que as citocinas analisadas apresentam papéis importantes na psoríase (SCHÖN; ERPENBECK, 2018). TNF- α é uma citocina que regula as ações de células imunes e produção de mediadores pró-inflamatórios. Um dos efeitos mais relevantes desta citocina é sua participação no eixo IL-23/ Th17, que envolve o processo patológico da psoríase. A IL-1 β , assim como a IL-6 estão associados ao eixo IL-23/ Th17, e medeiam a diferenciação de células T e queratinócitos, e a regulação positiva de outros mediadores inflamatórios (DENG; CHANG; LU, 2016; MAHIL; CAPON; BARKER, 2016). O TGF- β 1 exerce várias funções de acordo com a origem no tecido alvo ou tipos de células, e na psoríase, essa citocina apresenta níveis significativamente elevados que correlacionam com a gravidade da doença (HAN *et al.*, 2010).

Até o momento e de nosso conhecimento, este é o primeiro relatório sobre a produção e investigação dos efeitos antiinflamatórios *in vitro* de NLCs carregadas com triptolida e siRNA TNF α . Na literatura, estudos mostram que a veiculação de siRNA TNF- α em nanopartículas promove uma redução acentuada dos níveis de mediadores inflamatórios, além do TNF- α , e uma melhora do fenótipo psoriático (DESAI *et al.*, 2013; PETRILLI *et al.*, 2016; BOHR *et al.*, 2017; PANDI *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020). Por outro lado, investigações dos efeitos anti-inflamatórios de nanopartículas carregadas com triptolida permanece limitado. Zhang *et al.* (2018) reportaram que nanopartículas de ácido poli- γ -glutâmico carregadas com triptolida diminuíram os efeitos citotóxicos da triptolida livre, além de uma diminuição dos níveis de RNAm de TNF- α , IL-6, IL-1 β e iNOs em macrófagos induzidos com LPS/ IFN- γ (ZHANG *et al.*, 2018). Em outro estudo, Li *et al.* (2020) reportaram a produção de nanopartículas de dextrana-retinol carregadas com triptolida e funcionalizadas com galactosil que foram preferencialmente internalizadas por receptores galactose em macrófagos e mostraram inibir acentuadamente os níveis de RNAm de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em células estimuladas com TNF- α / LPS (LI *et al.*, 2020b).

Além dos efeitos anti-inflamatórios promovidos pela co-entrega de triptolida e siRNA TNF- α , observamos que as NLCs apresentam, apesar de menos pronunciado quando comparado as NLC com os ativos, um efeito modulador sobre os monócitos estimulados com LPS. Atribuímos este efeito a presença do ácido oleico, o qual é um ácido graxo insaturado (conhecido como ômega-9) e tem mostrado reduzir a inflamação *in vitro* e *in vivo*, pela regulação de diferentes vias de sinalização e mediadores pró-inflamatórios (CHEN *et al.*, 2019; SUREDA *et al.*, 2020; YU *et al.*,

2020). Além disso, a sua presença como agente da matriz lipídica em nanopartícula mostrou auxiliar na atividade anti-inflamatória do cilomilast em experimentos *in vitro* e em modelo animal com psoríase (LIN *et al.*, 2019).

Em conjunto, nossos resultados corroboram com o relatado na literatura para a atividade anti-inflamatória da triptolida e a eficácia da terapia mediada por RNAi para o silenciamento gênico de TNF- α . Além disso, mostramos que a co-entrega dos dois agentes terapêuticos apresentaram efeitos pronunciados e sinérgicos capazes de atenuar significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias nas células estimuladas com LPS. Acreditamos que, além das atividades farmacológicas reconhecidas da triptolida e do siRNA TNF- α , as características estruturais e físico-químicas das NLCs contribuíram para os resultados encontrados.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados e discussão apresentados, pôde-se concluir que:

- O método analítico em CLAE para quantificação da triptolida foi desenvolvido e validado atendendo os requisitos exigidos por normas nacionais e internacionais de validação;
- As NLCs apresentaram uma média de diâmetro hidrodinâmico de $159,5 \pm 7,5$ nm, PDI abaixo de 0,2, número de partículas por mililitros em torno de 5×10^{12} ; e uma eficiência de encapsulação de 90%;
- A incorporação do PAH a uma concentração de 0,5% proporcionou carga superficial positiva às NLCs (de -46 mV para +11,2 mV) e permitiu efetiva interação eletrostática com o siRNA. A presença da triptolida não alterou a mesoestrutura líquido-cristalina, identificada como hexagonal de acordo com as observações prévias do gel precursor sob microscopia de luz polarizada, e um padrão de espalhamento com picos de espalhamento na proporção $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$ (grupo de simetria $p6mm$ 2D);
- Observações morfológicas por AFM possibilitaram a análise da superfície das NLCs, que apresentaram propriedades mecânicas distintas, como dureza e elasticidade, relacionadas a sua composição lipídica;
- As NLCs contendo ou não a triptolida mantiveram-se estáveis por pelo menos 90 dias a 25 °C;
- Os hidrogéis formados por HEC e dispersões de NLCs foram caracterizados como fluido pseudoplástico não-newtoniano, com aspectos favoráveis à aplicação tópica e espalhabilidade, como adesividade e bioadesividade;
- Estudos em célula vertical de difusão de Franz mostraram que as tanto as NLCs, como o hidrogel contendo as NLCs, apresentaram liberação prolongada da triptolida em um período de 24 h;
- Em membrana biológica, as NLCs apresentaram um maior conteúdo de triptolida retido na epiderme e derme viável comparado ao conteúdo no estrato córneo e permeado, o que foi consideravelmente aumentado com a aplicação do hidrogel contendo as NLCs. Análises qualitativas mostraram a localização das NLCs complexadas com siRNA em regiões da epiderme e derme;

- Estudos em cultura celular mostraram que a presença do PAH conferiu maior citotoxicidade comparado as NLC aniônicas; em relação a triptolida, as NLCs atenuaram seus efeitos tóxicos (aumento de 3 vezes do IC₅₀ em relação à triptolida livre); mas ainda assim, a sua presença foi um fator de toxicidade para as células;
- As NLCs apresentaram rápida internalização celular, atingindo níveis acima de 80% após 6 horas de incubação; sendo possível a sua visualização por toda região citoplasmática e perinuclear. Os estudos com inibidores químicos de vias endocíticas revelaram que a internalização das NLCs é governada principalmente por macropinocitose e endocitose mediada por caveolina; e durante o tráfico intracelular ocorre escape endossomal após 6 h de incubação das células com as NLCs;
- Em cultura de monócitos primários humanos a exposição concomitante das NLCs multifuncionais com LPS diminuiu significativamente os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1. Para TNF- α e IL-6, o tratamento multifuncional exibiu efeitos sinérgicos, enquanto que para IL-1 β e TGF- β 1, a combinação dos agentes indicou um efeito aditivo. No segundo protocolo experimental, o tratamento com as NLCs multifuncionais após prévia estimulação com LPS, resultou na diminuição dos níveis de TNF- α , indicando um efeito sinérgico; enquanto que para as outras citocinas, o tratamento multifuncional resultou em um efeito aditivo;
- A veiculação da triptolida e de siRNA TNF- α nas NLCs proporcionou aumento da atividade (diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e 2 TGF- β 1) e silenciamento gênico (redução acentuada dos níveis de TNF- α , IL-1 β e TGF- β 10) quando comparados as suas aplicações isoladas e ao controle de NLC sem estes agentes terapêuticos.

Desta forma, pode-se concluir que as NLCs produzidas com monoleína, ácido oleico e PAH apresentaram características físicas, químicas e biológicas que as tornam um sistema carreador promissor para a co-veiculação de triptolida e siRNA visando a aplicação tópica desses agentes no tratamento da psoríase, e outras doenças cutâneas de ordem inflamatória. As NLCs foram capazes de superar as barreiras da administração tópica, e capazes de carregar a triptolida no seu interior lipídico, e externamente a presença de carga residual positiva advinda do PAH

permitiu a interação eletrostática com siRNA, e desta forma, proporcionaram a co-entrega desses dois agentes terapêuticos. Além disso, as altas taxas de internalização, e a capacidade de escape endo-lisossomal, com liberação eficiente de seu conteúdo, contribuíram fortemente para que fossem alcançados efeitos moduladores sobre a produção de mediadores inflamatórios presentes nos processos psoriáticos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAR, H. M.; EL BASSET SANAD, R. A. Endocytic pathways of optimized resveratrol cubosomes capturing into human hepatoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 561–569, set. 2017.
- ADAIR, A.; BERRY, J.; MCGREAL, S. Valuation of residential property: analysis of participant behaviour. **Journal of Property Valuation and Investment**, v. 14, n. 1, p. 20–35, mar. 1996.
- AIN, Q. U. et al. Gene Delivery to the Skin – How Far Have We Come? **Trends in Biotechnology**, p. 1–14, ago. 2020.
- AKBAR, S. et al. Phytantriol based smart nano-carriers for drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 31–42, 2017.
- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 15 ago. 2012.
- ALJUFFALI, I. A.; LIN, Y. K.; FANG, J. Y. Noninvasive approach for enhancing small interfering RNA delivery percutaneously. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 2, p. 265–280, 2016.
- AMAR-YULI, I. et al. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637–3645, 2007.
- AMERES, S. L.; MARTINEZ, J.; SCHROEDER, R. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 101–112, jul. 2007.
- ANDREOZZI, P. et al. Exploring the pH Sensitivity of Poly(allylamine) Phosphate Supramolecular Nanocarriers for Intracellular siRNA Delivery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 44, p. 38242–38254, 8 nov. 2017.
- ANGELOVA, A. et al. Advances in structural design of lipid-based nanoparticle carriers for delivery of macromolecular drugs, phytochemicals and anti-tumor agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, n. March, p. 331–345, 2017.
- ANVISA. Resolução De Diretoria Colegiada - RDC Nº 45, De 09 De Agosto De 2012. **Diário Oficial da União**, 2012.
- ASTOLFI, P. et al. Lyotropic Liquid-Crystalline Nanosystems as Drug Delivery Agents for 5-Fluorouracil: Structure and Cytotoxicity. **Langmuir**, v. 33, n. 43, p. 12369–12378, 2017.
- BADIE, H.; ABBAS, H. Novel small self-assembled resveratrol-bearing cubosomes and hexosomes: preparation, characterization, and *ex vivo* permeation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 12, p. 2013–2025, 2018.
- BELLEFRROID, C. et al. Lipid gene nanocarriers for the treatment of skin diseases: Current state-of-the-art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 137, n. January, p. 95–111, abr. 2019.
- BIBI, N.; AHMED, N.; KHAN, G. M. **Chapter 21 - Nanostructures in transdermal drug delivery systems**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- BOAKYE, C. H. A. et al. Novel amphiphilic lipid augments the co-delivery of erlotinib and IL36 siRNA into the skin for psoriasis treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 246, p. 120–132, 2017.
- BOCHEŃSKA, K. et al. Models in the Research Process of Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2514, 2017.
- BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. **Journal**

of **Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

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

BOHR, A. et al. Anti-Inflammatory Effect of Anti-TNF- α SiRNA Cationic Phosphorus Dendrimer Nanocomplexes Administered Intranasally in a Murine Acute Lung Injury Model. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 8, p. 2379–2388, 2017.

BOLEAN, M. et al. Topographic analysis by atomic force microscopy of proteoliposomes matrix vesicle mimetics harboring TNAP and AnxA5. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1911–1920, out. 2017.

BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 224, n. 3, p. 213–232, dez. 2006.

BOYD, B. J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 218–226, 2006.

BOYD, B. J. et al. Self-assembled geometric liquid-crystalline nanoparticles imaged in three dimensions: Hexosomes are not necessarily flat hexagonal prisms. **Langmuir**, v. 23, n. 25, p. 12461–12464, 2007.

CAILLAUD, M.; EL MADANI, M.; MASSAAD-MASSADE, L. Small interfering RNA from the lab discovery to patients' recovery. **Journal of Controlled Release**, v. 321, n. February, p. 616–628, maio 2020.

CALAUTTI, E.; AVALLE, L.; POLI, V. Psoriasis: A STAT3-centric view. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

CALDORERA-MOORE, M. et al. Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 479–495, 23 abr. 2010.

CALIXTO, L. S.; INFANTE, V. H. P.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1512–1519, 20 maio 2018.

CAMPOS, P. M. et al. Liquid crystalline nanodispersion functionalized with cell-penetrating peptides improves skin penetration and anti-inflammatory effect of lipoic acid after in vivo skin exposure to UVB radiation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1810–1828, 16 dez. 2020.

CANTON, I.; BATTAGLIA, G. Endocytosis at the nanoscale. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2718, 2012.

CARRASQUILLO, O. Y. et al. Treatment of erythrodermic psoriasis with biologics: A systematic review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p. 1–8, abr. 2020.

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, n. SUPPL. 3, p. 36–46, 2012.

CERUTTI, H.; CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Current Genetics**, v. 50, n. 2, p. 81–99, 12 ago. 2006.

CHAFIDZ, A. et al. Atomic Force Microscopy, thermal, viscoelastic and mechanical properties of HDPE/CaCO₃ nanocomposites. **Journal of Polymer Research**, v. 19, n. 4, p. 9860, 30 abr. 2012.

CHANG, X. L. et al. High-performance liquid chromatography determination of triptolide in vitro permeation studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 2, p. 215–221, 2005.

- CHAUDHARY, K. K.; KANNOJIA, P.; MISHRA, N. Liquid Crystal Systems in Drug Delivery. n. July, p. 217–243, 2016.
- CHAZOTTE, B. Labeling Mitochondria with Rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2011, n. 7, p. pdb.prot5640-pdb.prot5640, 1 jul. 2011.
- CHEN, C.-Y. et al. Oleic acid-loaded nanostructured lipid carrier inhibits neutrophil activities in the presence of albumin and alleviates skin inflammation. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 6539–6553, ago. 2019.
- CHEN, G. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triptolide-loaded liposome hydrogel patch under microneedles on rats with collagen-induced arthritis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 569–576, nov. 2015.
- CHEN, H. et al. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 3, p. 427–436, 2004.
- CHEN, H. et al. Hydrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at an extremely low concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1–2, p. 78–84, 2007.
- CHEN, H. et al. Co-delivery Strategies Based on Multifunctional Nanocarriers for Cancer Therapy. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 8, p. 1087–1096, 1 set. 2012.
- CHEN, J. G.; LIU, Y. F.; GAO, T. W. Preparation and anti-inflammatory activity of triptolide ethosomes in an erythema model. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 4, p. 297–303, 2010.
- CHEN, L. et al. Triptolide-loaded microemulsion-based hydrogels: physical properties and percutaneous permeability. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 3, p. 185–192, 2013.
- CHEN, S. R. et al. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. FEB, p. 1–13, 2018.
- CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CHENG, J. et al. Structure–Function Correlation of Chloroquine and Analogues as Transgene Expression Enhancers in Nonviral Gene Delivery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 22, p. 6522–6531, nov. 2006.
- CHIRICOZZI, A. et al. Treatment of psoriasis with topical agents: Recommendations from a Tuscany Consensus. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 6, p. 1–10, 2017.
- CHIRICOZZI, A. et al. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 179, 8 jan. 2018.
- CHOU, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, set. 2006.
- CHOUNTOULESI, M. et al. Cubic lyotropic liquid crystals as drug delivery carriers: Physicochemical and morphological studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 550, n. 1–2, p. 57–70, 2018.
- CHU, S.; TANG, C.; YIN, C. Effects of mannose density on invitro and invivo cellular uptake and RNAi efficiency of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 52, n. 1, p. 229–239, 2015.
- CIECHANOWICZ, P. et al. JAK-inhibitors in dermatology: current evidence and future applications. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 0, n. 0, p. 000, 2018.
- CLARES, B. et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 591–598, out. 2014.

- CLARK, R. A. Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2084–2087, 1 ago. 2006.
- CONNOR, V. Anti-TNF therapies: a comprehensive analysis of adverse effects associated with immunosuppression. **Rheumatology International**, v. 31, n. 3, p. 327–337, 16 mar. 2011.
- CONRAD, C.; GILLIET, M. Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 54, n. 1, p. 102–113, 2018.
- CONSTANTINESCU, C. A. et al. Targeted Transfection Using PEGylated Cationic Liposomes Directed Towards P-Selectin Increases siRNA Delivery into Activated Endothelial Cells. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 47, 21 jan. 2019.
- CORADINI, K. et al. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: In vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 163–170, out. 2015.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, maio 2001.
- DAVIS, M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1067–1070, 21 abr. 2010.
- DE CAMPO, L. et al. Reversible Phase Transitions in Emulsified Nanostructured Lipid Systems. **Langmuir**, v. 20, n. 13, p. 5254–5261, jun. 2004.
- DELIĆ, D. et al. Integrated microRNA/mRNA expression profiling of the skin of psoriasis patients. **Journal of Dermatological Science**, v. 97, n. 1, p. 9–20, jan. 2020.
- DENG, Y.; CHANG, C.; LU, Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 50, n. 3, p. 377–389, 2016.
- DEPIERI, L. V. et al. RNAi mediated IL-6 in vitro knockdown in psoriasis skin model with topical siRNA delivery system based on liquid crystalline phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 50–58, 2016.
- DESAI, P. R. et al. Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 51–63, ago. 2013.
- DESFRAŇÇOIS, C.; AUZÉLY, R.; TEXIER, I. Lipid Nanoparticles and Their Hydrogel Composites for Drug Delivery: A Review. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 118, 1 nov. 2018.
- DESHPANDE, S.; SINGH, N. Influence of Cubosome Surface Architecture on Its Cellular Uptake Mechanism. **Langmuir**, v. 33, n. 14, p. 3509–3516, 2017.
- DESMET, E. et al. An elastic liposomal formulation for RNAi-based topical treatment of skin disorders: Proof-of-concept in the treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 500, n. 1–2, p. 268–274, 2016.
- DI SILVIO, D. et al. Self-assembly of poly(allylamine)/siRNA nanoparticles, their intracellular fate and siRNA delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 557, p. 757–766, 1 dez. 2019.
- DIERKING, I.; AL-ZANGANA, S. Lyotropic Liquid Crystal Phases from Anisotropic Nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 7, n. 10, p. 305, 1 out. 2017.
- DING, B. et al. Triptolide and celastrol loaded silk fibroin nanoparticles show synergistic effect against human pancreatic cancer cells. **Nanoscale**, v. 9, n. 32, p. 11739–11753, 2017.
- DONAHUE, N. D.; ACAR, H.; WILHELM, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 143, p. 68–96, mar. 2019.

- DONG, Y. Da; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 101–111, 2011.
- DONG, Y.; SIEGWART, D. J.; ANDERSON, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p. 133–147, abr. 2019.
- DOPPALAPUDI, S.; MAHIRA, S.; KHAN, W. Development and in vitro assessment of psoralen and resveratrol co-loaded ultradeformable liposomes for the treatment of vitiligo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. July, p. 44–57, 2017.
- DUNN, K. W.; KAMOCCA, M. M.; MCDONALD, J. H. A Practical Guide to Evaluating Colocalization in Biological Microscopy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 4, p. C723–C742, abr. 2011.
- DURYMANOV, M.; REINEKE, J. Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–15, 21 ago. 2018.
- DYETT, B. P. et al. Fusion dynamics of cubosome nanocarriers with model cell membranes. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4492, 3 dez. 2019.
- DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 6, p. 457–467, jun. 2003.
- EL-SAYED, A.; HARASHIMA, H. Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 6, p. 1118–1130, jun. 2013.
- ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494–498, maio 2001.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5–6, p. 755–767, mar. 2001.
- EUROPEAN COMMISSION. **SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 10th revision**. [s.l.: s.n.]v. 1602
- FANG, J.-Y. et al. Cationic additives in nanosystems activate cytotoxicity and inflammatory response of human neutrophils: lipid nanoparticles versus polymeric nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 371, jan. 2015.
- FDA. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**. [s.l.: s.n.]
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, fev. 1998.
- FONG, W.-K. et al. Responsive self-assembled nanostructured lipid systems for drug delivery and diagnostics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 484, p. 320–339, dez. 2016.
- FONG, W.-K.; HANLEY, T.; BOYD, B. J. Stimuli responsive liquid crystals provide “on-demand” drug delivery in vitro and in vivo. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 135, n. 3, p. 218–26, maio 2009.
- FONSECA-SANTOS, B. et al. An effective mosquito-repellent topical product from liquid crystal-based tea tree oil. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. August 2018, p. 488–495, 2019.
- FOTIADOU, C. et al. Targeting IL-23 in psoriasis: current perspectives. **Psoriasis: Targets and Therapy**, v. Volume 8, p. 1–5, 2018.
- GABR, M. M.; MORTADA, S. M.; SALLAM, M. A. Hexagonal Liquid Crystalline

- Nanodispersions Proven Superiority for Enhanced Oral Delivery of Rosuvastatin: In Vitro Characterization and In Vivo Pharmacokinetic Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3103–3112, out. 2017.
- GARBOVSKIY, Y. A.; GLUSHCHENKO, A. V. Liquid Crystalline Colloids of Nanoparticles. In: **Solid State Physics - Advances in Research and Applications**. [s.l: s.n.]62p. 1–74.
- GASPAR, L. .; MAIA CAMPOS, P. M. B. . Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 35–44, jan. 2003.
- GAZGA-URIESTE, C. et al. Physicochemical characterization and thermal behavior of hexosomes containing ketoconazole as potential topical antifungal delivery system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 1, p. 168–176, 2019.
- GHICA, M. et al. Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 786, 16 jun. 2016.
- GILBERT, L. et al. Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 421, p. 150–163, mar. 2013.
- GU, Y. et al. Lipid nanoparticles loading triptolide for transdermal delivery: mechanisms of penetration enhancement and transport properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 68, 15 dez. 2018.
- GU, Y. et al. Transdermal drug delivery of triptolide-loaded nanostructured lipid carriers: Preparation, pharmacokinetic, and evaluation for rheumatoid arthritis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 554, p. 235–244, jan. 2019.
- GUO, S. et al. Enhanced Gene Delivery and siRNA Silencing by Gold Nanoparticles Coated with Charge-Reversal Polyelectrolyte. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5505–5511, 28 set. 2010.
- GUSTAFSSON, J. et al. Submicron Particles of Reversed Lipid Phases in Water Stabilized by a Nonionic Amphiphilic Polymer. **Langmuir**, v. 13, n. 26, p. 6964–6971, 1997.
- HAMCZYK, M. R.; VILLA-BELLOSTA, R.; ANDRÉS, V. In Vitro Macrophage Phagocytosis Assay. In: ANDRÉS, V.; DORADO, B. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2015. 1339p. 235–246.
- HAN, G. et al. A Role for TGF β Signaling in the Pathogenesis of Psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 371–377, fev. 2010.
- HAN, L. et al. Enhanced siRNA Delivery and Silencing Gold–Chitosan Nanosystem with Surface Charge-Reversal Polymer Assembly and Good Biocompatibility. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 7340–7351, 28 ago. 2012a.
- HAN, L.; TANG, C.; YIN, C. Dual-targeting and pH/redox-responsive multi-layered nanocomplexes for smart co-delivery of doxorubicin and siRNA. **Biomaterials**, v. 60, p. 42–52, ago. 2015.
- HAN, R. et al. Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 424–436, 2012b.
- HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25–38, 2017.
- HIMMELSTOSS, S. F.; HIRSCH, T. Long-Term Colloidal and Chemical Stability in Aqueous Media of NaYF₄ -Type Upconversion Nanoparticles Modified by Ligand-Exchange. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 36, n. 10, p. 1900235, 5 out. 2019.
- HOLSTEIN, J. et al. Anthralin modulates the expression pattern of cytokeratins and antimicrobial peptides by psoriatic keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, v. 87, n. 3, p. 236–245, 2017.

- HOU, W.; LIU, B.; XU, H. Triptolide: Medicinal chemistry, chemical biology and clinical progress. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 378–392, ago. 2019.
- HOYLE, G. W. et al. Development and assessment of countermeasure formulations for treatment of lung injury induced by chlorine inhalation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 298, p. 9–18, maio 2016.
- HUANG, Y.; GUI, S. Factors affecting the structure of lyotropic liquid crystals and the correlation between structure and drug diffusion. **RSC Advances**, v. 8, n. 13, p. 6978–6987, 2018.
- HUANG, Y.; GUO, J.; GUI, S. Orally targeted galactosylated chitosan poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with TNF- α siRNA provide a novel strategy for the experimental treatment of ulcerative colitis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 125, n. June, p. 232–243, 2018.
- HURLER, J. et al. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 1, p. 180–188, 5 jul. 2012.
- HYDE, S. T. Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, Volumes 1-2**, p. 299–321, 2001.
- ICH; GUIDELINE, H. T. Evaluation of stability data Q1E. In: **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices**. [s.l.: s.n.]p. 263–283.
- ICH, H. T. G. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. [s.l.: s.n.]v. 1994
- ITA, K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. December 2019, p. 105358, jul. 2020.
- JABŁONOWSKA, E. et al. Lipid membranes exposed to dispersions of phytantriol and monoolein cubosomes: Langmuir monolayer and HeLa cell membrane studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 1, p. 129738, jan. 2021.
- JAIN, S. et al. Improved Oral Bioavailability, Therapeutic Efficacy, and Reduced Toxicity of Tamoxifen-Loaded Liquid Crystalline Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 460–469, 2017.
- JAIN, S. et al. Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus loaded nanoformulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, n. March, p. 96–104, 2019.
- JAMES, P. J. et al. Interpretation of Contrast in Tapping Mode AFM and Shear Force Microscopy. A Study of Nafion. **Langmuir**, v. 17, n. 2, p. 349–360, jan. 2001.
- JEE, M. H. et al. $\gamma\delta$ T cells and inflammatory skin diseases. **Immunological Reviews**, v. 298, n. July, p. imr.12913, 27 ago. 2020.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 2, p. 223–233, 26 maio 1997.
- KABASHIMA, K. et al. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 1, p. 19–30, 14 jan. 2019.
- KACZMAREK, J. C.; KOWALSKI, P. S.; ANDERSON, D. G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2017.
- KARGAARD, A.; SLUIJTER, J. P. G.; KLUMPERMAN, B. Polymeric siRNA gene delivery – transfection efficiency versus cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 316, n. November, p. 263–291, dez. 2019.

- KHALIL, S. et al. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 28, n. 8, p. 684–696, 2017.
- KHURANA, S.; BEDI, P. M. S.; JAIN, N. K. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 175–176, p. 65–72, out. 2013.
- KIM, B.; PARK, J.; SAILOR, M. J. Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. **Advanced Materials**, v. 31, n. 49, p. 1903637, 30 dez. 2019.
- KIM, H.; LEAL, C. Cuboplexes: Topologically Active siRNA Delivery. **ACS Nano**, v. 9, n. 10, p. 10214–10226, 27 out. 2015.
- KOYNOVA, R.; TENCHOV, B.; MACDONALD, R. C. Nonlamellar Phases in Cationic Phospholipids, Relevance to Drug and Gene Delivery. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 1, n. 3, p. 130–138, 2015.
- KRIEG, B. et al. New Techniques to Assess In Vitro Release of siRNA from Nanoscale Polyplexes. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 6, p. 1957–1974, 9 jun. 2015.
- KULKARNI, C. V. et al. Monoolein: A magic lipid? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 8, p. 3004–3021, 2011.
- LADEMANN, J. et al. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 317–323, jun. 2009.
- LANCELOT, A.; SIERRA, T.; SERRANO, J. L. Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 4, p. 547–564, 2014.
- LEAL, C. et al. Highly Efficient Gene Silencing Activity of siRNA Embedded in a Nanostructured Gyroid Cubic Lipid Matrix. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 47, p. 16841–16847, dez. 2010.
- LEAL, C. et al. Nanogyroids Incorporating Multivalent Lipids: Enhanced Membrane Charge Density and Pore Forming Ability for Gene Silencing. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7691–7697, 21 jun. 2011.
- LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88–98, jun. 2009.
- LEEKUMJORN, S. et al. The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 7, p. 1508–1516, jul. 2009.
- LI, B. et al. The role of Th17 cells in psoriasis. **Immunologic Research**, p. 62–81, 22 ago. 2020a.
- LI, H.; WEN, X. S.; DI, W. In vitro and in vivo evaluation of Triptolide-loaded Pluronic P105 polymeric micelles. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 62, n. 7, p. 340–344, 2012.
- LI, J.-C. et al. Self-Assembled Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles for Transdermal Delivery of Paeonol. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 3298–3310, 2015.
- LI, J.; HAO, J. Treatment of Neurodegenerative Diseases with Bioactive Components of *Tripterygium wilfordii*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 47, n. 4, p. 769–785, 2019.
- LI, P. et al. Synergistic effect of all-trans-retinal and triptolide encapsulated in an inflammation-targeted nanoparticle on collagen-induced arthritis in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 319, n. August 2019, p. 87–103, mar. 2020b.
- LI, X. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution study in mice of triptolide-loaded lipid

- emulsion and accumulation effect on pancreas. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1344–1354, 2016.
- LI, X. J.; JIANG, Z. Z.; ZHANG, L. Y. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 67–79, 2014.
- LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, n. 2, p. 375–386, 2011.
- LIN, A. J. et al. Three-Dimensional Imaging of Lipid Gene-Carriers: Membrane Charge Density Controls Universal Transfection Behavior in Lamellar Cationic Liposome-DNA Complexes. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 5, p. 3307–3316, maio 2003.
- LIN, C.-Y. et al. Oleic acid as the active agent and lipid matrix in cilomilast-loaded nanocarriers to assist PDE4 inhibition of activated neutrophils for mitigating psoriasis-like lesions. **Acta Biomaterialia**, v. 90, p. 350–361, maio 2019.
- LIN, C. et al. Dual-ligand modified liposomes provide effective local targeted delivery of lung-cancer drug by antibody and tumor lineage-homing cell-penetrating peptide. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 256–266, 15 jan. 2018a.
- LIN, S.-H. et al. Treatment with TNF- α inhibitor rectifies M1 macrophage polarization from blood CD14+ monocytes in patients with psoriasis independent of STAT1 and IRF-1 activation. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 3, p. 276–284, set. 2018b.
- LING, D. et al. pH-Sensitive Nanoformulated Triptolide as a Targeted Therapeutic Strategy for Hepatocellular Carcinoma. **ACS Nano**, v. 8, n. 8, p. 8027–8039, 26 ago. 2014.
- LIU, F. et al. Current Transport Systems and Clinical Applications for Small Interfering RNA (siRNA) Drugs. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 22, n. 5, p. 551–569, 20 out. 2018a.
- LIU, J. et al. Synergistic combination therapy of lung cancer using paclitaxel- and triptolide-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 3199–3209, set. 2018b.
- LIU, M. et al. Anti-inflammatory effects of triptolide loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 219–225, 2005.
- LIU, M. et al. Effect of Poly(D, L-lactic acid) Nanoparticles as Triptolide Carrier on Abating Rats Renal Toxicity by NMR-Based Metabolic Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 7, p. 3493–3499, 2008.
- LIU, Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 377–383, 2011.
- LIU, Q. et al. Sensitivity of Nanostructure in Charged Cubosomes to Phase Changes Triggered by Ionic Species in Solution. **Langmuir**, v. 29, n. 46, p. 14265–14273, 19 nov. 2013.
- LOPES, L. B. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332–1342, 2006.
- LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 209–215, nov. 2007.
- MA, Y. et al. Labeling and long-term tracking of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro using NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ upconversion nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 42, p. 199–208, 2016.
- MADHESWARAN, T. et al. Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl

- Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 44–51, 2014.
- MAHIL, S. K.; CAPON, F.; BARKER, J. N. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 1, p. 11–27, 16 jan. 2016.
- MAITRA, U. et al. Molecular Mechanisms Responsible for the Selective and Low-Grade Induction of Proinflammatory Mediators in Murine Macrophages by Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 1014–1023, 15 jul. 2012.
- MALCOLM, D. W. et al. The Effects of Biological Fluids on Colloidal Stability and siRNA Delivery of a pH-Responsive Micellar Nanoparticle Delivery System. **ACS Nano**, v. 12, n. 1, p. 187–197, 23 jan. 2018.
- MALECIC, N.; YOUNG, H. Tacrolimus for the management of psoriasis: clinical utility and place in therapy. **Psoriasis (Auckland, N.Z.)**, v. 6, p. 153–163, 2016.
- MANAIA, E. B. et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4991–5011, 2017.
- MANSOUR, M. et al. Novel polyglycerol-dioleate based cubosomal dispersion with tailored physical characteristics for controlled delivery of ondansetron. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 44–54, 2017.
- MATTA, R. et al. Triptolide induces anti-inflammatory cellular responses. **American Journal of Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 267–282, 2009.
- MEI, L. et al. Injectable in situ forming gel based on lyotropic liquid crystal for persistent postoperative analgesia. **Acta biomaterialia**, v. 67, p. 99–110, 2018.
- MEI, Z. et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 189–196, 2003.
- MEI, Z. et al. Triptolide Loaded Solid Lipid Nanoparticle Hydrogel for Topical Application. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 2, p. 161–168, 26 jan. 2005.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 15 set. 2004.
- MERTINS, O.; MATHEWS, P. D.; ANGELOVA, A. Advances in the Design of pH-Sensitive Cubosome Liquid Crystalline Nanocarriers for Drug Delivery Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 963, 18 maio 2020.
- MEZZENGA, R. et al. Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. **Advanced Materials**, v. 31, n. 35, p. 1900818, 20 ago. 2019.
- MICHALEK, I. M.; LORING, B.; JOHN, S. M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, n. 2, p. 205–212, fev. 2017.
- MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 569–587, jan. 2015.
- MISHRAKI-BERKOWITZ, T.; ASERIN, A.; GARTI, N. Structural properties and release of insulin-loaded reverse hexagonal (HII) liquid crystalline mesophase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 486, p. 184–193, 2017.
- MITOV, M. Liquid-Crystal Science from 1888 to 1922: Building a Revolution. **ChemPhysChem**, v. 15, n. 7, p. 1245–1250, maio 2014.
- MO, J.; MILLERET, G.; NAGARAJ, M. Liquid crystal nanoparticles for commercial drug delivery. **Liquid Crystals Reviews**, v. 5, n. 2, p. 69–85, jul. 2017.

- MOHYELDIN, S. M.; MEHANNA, M. M.; ELGINDY, N. A. Superiority of liquid crystalline cubic nanocarriers as hormonal transdermal vehicle: comparative human skin permeation-supported evidence. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 8, p. 1049–1064, 2 ago. 2016.
- MORITA, A. Current developments in phototherapy for psoriasis. **Journal of Dermatology**, v. 45, n. 3, p. 287–292, 2018.
- MULET, X.; BOYD, B. J.; DRUMMOND, C. J. Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 393, n. 1, p. 1–20, 2013.
- MULLINEUX, G. Non-linear least squares fitting of coefficients in the Herschel–Bulkley model. **Applied Mathematical Modelling**, v. 32, n. 12, p. 2538–2551, dez. 2008.
- MURDACA, G. et al. Update upon the infection risk in patients receiving TNF alpha inhibitors. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 18, n. 3, p. 219–229, 4 mar. 2019.
- MURGIA, S. et al. Cubosome formulations stabilized by a dansyl-conjugated block copolymer for possible nanomedicine applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 87–94, maio 2015.
- NAZARUK, E. et al. Design and assembly of pH-sensitive lipidic cubic phase matrices for drug release. **Langmuir**, v. 30, n. 5, p. 1383–1390, 2014.
- NAZARUK, E. et al. Lyotropic Cubic Phases for Drug Delivery: Diffusion and Sustained Release from the Mesophase Evaluated by Electrochemical Methods. **Langmuir**, v. 31, n. 46, p. 12753–12761, 2015.
- NEGRINI, R. et al. PH-responsive lyotropic liquid crystals and their potential therapeutic role in cancer treatment. **Chemical Communications**, v. 51, n. 30, p. 6671–6674, 2015.
- NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. Diffusion, Molecular Separation, and Drug Delivery from Lipid Mesophases with Tunable Water Channels. **Langmuir**, v. 28, n. 47, p. 16455–16462, 27 nov. 2012.
- NELEMANS, L. C.; GUREVICH, L. Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers—Cellular Uptake Mechanisms. **Materials**, v. 13, n. 2, p. 366, 13 jan. 2020.
- NEMATI, H. et al. Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 268, p. 259–268, 2017.
- NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679–691, 18 out. 2009.
- NETO, C. et al. Imaging Soft Matter with the Atomic Force Microscope: Cubosomes and Hexosomes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 19, p. 3896–3899, 1999.
- OGAWA, E. et al. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. **The Journal of Dermatology**, v. 45, n. 3, p. 264–272, mar. 2018.
- OLIVEIRA, R. et al. Treatment for chemical burning using liquid crystalline nanoparticles as an ophthalmic delivery system for pifenedone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 568, n. June, p. 118466, 2019.
- ORECCHIONI, M. et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 24 maio 2019.
- PAGANO, C. et al. Bioadhesive polymeric films based on usnic acid for burn wound treatment: Antibacterial and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. March, p. 488–499, jun. 2019.
- PANDI, P. et al. Dendrimer as a new potential carrier for topical delivery of siRNA: A

- comparative study of dendriplex vs. lipoplex for delivery of TNF- α siRNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 550, n. 1–2, p. 240–250, 2018.
- PASTOR-FERNÁNDEZ, G.; MARIBLANCA, I. R.; NAVARRO, M. N. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2044, 7 set. 2020.
- PATEL, S. et al. Brief update on endocytosis of nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p. 90–111, abr. 2019.
- PETRILLI, R. et al. Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: A proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 1063–1075, 2016.
- PHILIP, H.-M. Liquid Crystal Physics and Materials. **Encyclopedia of Modern Optics**, v. 3, p. 8–11, 2017.
- PRAÇA, F. S. G. et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. August 2017, p. 121–132, 2018.
- PRAJAPATI, R.; LARSEN, S. W.; YAGHMUR, A. Citrem–phosphatidylcholine nano-self-assemblies: solubilization of bupivacaine and its role in triggering a colloidal transition from vesicles to cubosomes and hexosomes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 27, p. 15142–15150, 2019.
- PREMKUMAR, V. et al. MyD88-dependent and independent pathways of Toll-Like Receptors are engaged in biological activity of Triptolide in ligand-stimulated macrophages. **BMC Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 3, 2010.
- PUERTAS-BARTOLOMÉ, M. et al. Bioadhesive functional hydrogels: Controlled release of catechol species with antioxidant and antiinflammatory behavior. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110040, dez. 2019.
- QIN, F. et al. A DNA transporter based on mesoporous silica nanospheres mediated with polycation poly(allylamine hydrochloride) coating on mesopore surface. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 90, n. 2, p. 333–338, 2009.
- QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 223–234, fev. 2000.
- RADAIC, A. et al. Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1236–1244, 15 ago. 2016.
- RAI, R.; ALWANI, S.; BADEA, I. Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications. **Polymers**, v. 11, n. 4, p. 745, 25 abr. 2019.
- RAWAL, M.; SINGH, A.; AMIJI, M. M. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 11, p. 153, 3 nov. 2019.
- REAM, J. A.; LEWIS, L. K.; LEWIS, K. A. Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. **Analytical Biochemistry**, v. 511, p. 36–41, out. 2016.
- RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1475, 23 mar. 2019.
- RIGON, C. et al. Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents effective anti-inflammatory action in a model of irritant contact dermatitis in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, n. June, p. 104969, set. 2019.
- RIMEL, J. K.; TAATJES, D. J. The essential and multifunctional TFIID complex. **Protein**

Science, v. 27, n. 6, p. 1018–1037, jun. 2018.

RIOS, F. J.; TOUYZ, R. M.; MONTEZANO, A. C. Isolation and Differentiation of Human Macrophages. In: **Hypertension: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]1527p. 311–320.

RIVOLTA, I.; PANARITI; MISEROCCHI. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 5, n. 1, p. 87, set. 2012.

ROBERTS, M. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, fev. 2017.

RODRIGUES, L. et al. Characterization of Lipid-Based Hexosomes as Versatile Vaccine Carriers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 3945–3954, 7 nov. 2016.

RODRIGUEZ-VALLECILLO, E.; WOODBURY-FARIÑA, M. A. Dermatological manifestations of stress in normal and psychiatric populations. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 625–651, 2014.

ROSA, J. et al. Current non-viral siRNA delivery systems as a promising treatment of skin diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 23, p. 2644–2663, ago. 2018.

ROSSETTI, F. C. et al. Analysis of Liquid Crystalline Nanoparticles by Small Angle X-Ray Diffraction: Evaluation of Drug and Pharmaceutical Additives Influence on the Internal Structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2849–2857, jul. 2011.

ROSSETTI, F. C. et al. Optimization of protoporphyrin IX skin delivery for topical photodynamic therapy: Nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 99–108, fev. 2016.

SALAH, S.; MAHMOUD, A. A.; KAMEL, A. O. Etodolac transdermal cubosomes for the treatment of rheumatoid arthritis: Ex vivo permeation and in vivo pharmacokinetic studies. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 846–856, 2017.

SALAMEH, J. W. et al. Polymer-mediated gene therapy: Recent advances and merging of delivery techniques. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 2, 2 mar. 2020.

SASHITAL, D. G.; DOUDNA, J. A. Structural insights into RNA interference. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 1, p. 90–97, fev. 2010.

SATO, Y. et al. Neutralization of negative charges of siRNA results in improved safety and efficient gene silencing activity of lipid nanoparticles loaded with high levels of siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 284, n. June, p. 179–187, ago. 2018.

SCHOLZ, C.; WAGNER, E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 554–565, jul. 2012.

SCHÖN, M. P. Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis and Other Inflammatory Disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. July, p. 5–9, 26 jul. 2019.

SCHÖN, M. P.; ERPENBECK, L. The Interleukin-23/Interleukin-17 Axis Links Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 15 jun. 2018.

SEDDON, J. M.; TEMPLER, R. H. Polymorphism of Lipid-Water Systems. In: [s.l.: s.n.]1p. 97–160.

SEKHON, S. et al. Review of the mechanism of action of coal tar in psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 0, n. 0, p. 1–3, 2017.

SELBY, L. I. et al. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and**

Nanobiotechnology, v. 9, n. 5, p. e1452, set. 2017.

SETTEN, R. L.; ROSSI, J. J.; HAN, S. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 6, p. 421–446, 7 jun. 2019.

SHALHOUT, S. Z. et al. Evaluation of the fragility of pivotal trials used to support US Food and Drug Administration approval for plaque psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p. 1–7, abr. 2020.

SHEN, J. et al. Engineering functional inorganic-organic hybrid systems: Advances in siRNA therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 6, p. 1969–1995, 2018.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, n. 5, p. 409–415, 24 out. 2013.

SHERIF, S.; BENDAS, E. R.; BADAWY, S. The clinical efficacy of cosmeceutical application of liquid crystalline nanostructured dispersions of alpha lipoic acid as anti-wrinkle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 251–259, fev. 2014.

SIEKMANN, B. et al. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride–water phases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1–2, p. 33–43, set. 2002.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6–12, out. 2011.

SILVA, A. C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 241–248, maio 2012.

SILVESTRINI, A. V. P. et al. Advances in lyotropic liquid crystal systems for skin drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 00, n. 00, p. 1–25, 18 set. 2020.

SINGHA, K.; NAMGUNG, R.; KIM, W. J. Polymers in Small-Interfering RNA Delivery. v. 21, n. 3, p. 133–148, 2011.

SONG, C. et al. Triptolide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in human endothelial cells: involvement of NF- κ B pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 198, 2 dez. 2019.

SONG, Y.; TANG, C.; YIN, C. Combination antitumor immunotherapy with VEGF and PIGF siRNA via systemic delivery of multi-functionalized nanoparticles to tumor-associated macrophages and breast cancer cells. **Biomaterials**, v. 185, p. 117–132, dez. 2018.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. Polymeric Hydrogels as Technology Platform for Drug Delivery Applications. **Gels**, v. 3, n. 3, p. 25, 3 jul. 2017.

SPICER, P. T. et al. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). **Langmuir**, v. 17, n. 19, p. 5748–5756, 2001.

STRACHAN, J. B. et al. Toxicity and cellular uptake of lipid nanoparticles of different structure and composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 576, p. 241–251, set. 2020.

SUREDA, A. et al. Effect of Free Fatty Acids on Inflammatory Gene Expression and Hydrogen Peroxide Production by Ex Vivo Blood Mononuclear Cells. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 146, 4 jan. 2020.

TAI, W.; GAO, X. Functional peptides for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 110–111, n. 6188, p. 157–168, fev. 2017.

TAKEMOTO, H.; NISHIYAMA, N. Functional polymer-based siRNA delivery carrier that recognizes site-specific biosignals. **Journal of Controlled Release**, v. 267, n. August, p. 90–

99, dez. 2017.

TAN, A. et al. Self-Assembled Nanostructured Lipid Systems: Is There a Link between Structure and Cytotoxicity? **Advanced Science**, v. 6, n. 3, p. 1801223, 12 fev. 2019.

TASNEEM, S. et al. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 126–140, jan. 2019.

TATIPARTI, K. et al. siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. **Nanomaterials**, v. 7, n. 4, p. 77, 2017.

TEO, P. Y. et al. Co-delivery of drugs and plasmid DNA for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 98, p. 41–63, 2016.

TOFANI, L. B. et al. In Vitro TyRP-1 Knockdown Based on siRNA Carried by Liquid Crystalline Nanodispersions: an Alternative Approach for Topical Treatment of Vitiligo. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 5, p. 104, 20 maio 2018.

TORRES, T.; PUIG, L. Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 23–32, 2018.

TRAN, N. et al. Non-lamellar lyotropic liquid crystalline nanoparticles enhance the antibacterial effects of rifampicin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 519, p. 107–118, 2018.

TSAI, Y.-C.; TSAI, T.-F. Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 9, n. 11, p. 277–294, 6 nov. 2017.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v. 387, n. June, p. 27–42, jul. 2017.

TU, H. et al. Triptolide inhibits IFN- γ signaling via the Jak/STAT pathway in HaCaT keratinocytes. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1678–1685, 2011.

TUNG, N.-T.; VU, V.-D.; NGUYEN, P.-L. DoE-based development, physicochemical characterization, and pharmacological evaluation of a topical hydrogel containing betamethasone dipropionate microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. June, p. 480–488, set. 2019.

UCHINO, T. et al. Glyceryl monooleyl ether-based liquid crystalline nanoparticles as a transdermal delivery system of flurbiprofen: characterization and in vitro transport. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 63, n. 5, p. 334–40, 2015.

UCHINO, T. et al. Study on the drug permeation mechanism from flurbiprofen-loaded glyceryl monooleyl ether-based lyotropic liquid crystalline nanoparticles across the skin: Synchrotron X-ray diffraction and confocal laser scanning microscopy study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. July 2018, p. 259–269, jan. 2019.

ULUDAG, H.; UBEDA, A.; ANSARI, A. At the Intersection of Biomaterials and Gene Therapy: Progress in Non-viral Delivery of Nucleic Acids. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, p. 1–21, 4 jun. 2019.

URANDUR, S. et al. Anisamide-Anchored Lyotropic Nano-Liquid Crystalline Particles with AIE Effect: A Smart Optical Beacon for Tumor Imaging and Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 15, p. 12960–12974, 2018.

USP38/NF33. Validation of Compendial Methods Section. **The United State Pharmacopeial/National Formulary**, p. 2256, 2015.

VAN'T HAG, L. et al. Lyotropic liquid crystal engineering moving beyond binary compositional space-ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials by design. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2705–2731, 2017.

- VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16–24, jan. 2013a.
- VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 915–931, 24 abr. 2013b.
- VIDEIRA, M. et al. Preclinical development of siRNA therapeutics: Towards the match between fundamental science and engineered systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 689–702, maio 2014.
- VIEGAS, J. S. R. et al. Nanostructured lipid carrier co-delivering tacrolimus and TNF- α siRNA as an innovate approach to psoriasis. **Drug Delivery and Translational Research**, 14 fev. 2020.
- WAGNER, E. F. et al. Psoriasis: What we have learned from mouse models. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 704–714, 2010.
- WALVEKAR, P.; GANNIMANI, R.; GOVENDER, T. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 121–141, jan. 2019.
- WANG, B. et al. Cellular Uptake of Covalent Poly(allylamine hydrochloride) Microcapsules and Its Influences on Cell Functions. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 11, p. 1534–1545, 2012.
- WANG, C. et al. Inhibition of Cancer Angiogenesis Using Triptolide Nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 5, p. 805–815, 1 maio 2015a.
- WANG, Y. et al. Assembling Mn:ZnSe quantum dots-siRNA nanoplexes for gene silencing in tumor cells. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 1, p. 192–202, 2015b.
- WANG, Y.; LIU, T.; LI, H. Enhancement of triptolide-loaded micelles on tumorigenicity inhibition of human ovarian cancer. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 7, p. 545–556, 2 maio 2016.
- WENG, Y. et al. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 801–825, set. 2019.
- WITTRUP, A.; LIEBERMAN, J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 9, p. 543–552, 18 set. 2015.
- WOJNILEWICZ, M. et al. Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. **ACS Nano**, v. 13, n. 1, p. 187–202, 22 jan. 2019.
- WOO, Y. R.; CHO, D. H.; PARK, H. J. Molecular mechanisms and management of a cutaneous inflammatory disorder: Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.
- WORLE, G. et al. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 150–157, 1 fev. 2007.
- WU, B. et al. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for in vitro and in vivo synergistic cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1853–1862, 2017.
- XI, C. et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 90, p. 531–541, 2017.
- XU, C. et al. pH-triggered charge-reversal and redox-sensitive drug release polymer micelles co-deliver doxorubicin and triptolide for prostate tumor therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 13, p. 7229–7249, nov. 2018.

- XU, L. et al. In vivo evaluation of the safety of triptolide-loaded hydrogel-thickened microemulsion. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3792–3799, 2008a.
- XU, L. et al. Anti-tumour and immuno-modulation effects of triptolide-loaded polymeric micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 741–748, nov. 2008b.
- XU, L. et al. Acute and subacute toxicity studies on triptolide and triptolide-loaded polymeric micelles following intravenous administration in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 371–379, jul. 2013.
- XU, P. et al. Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 327, jan. 2014.
- XUE, M. et al. Comparison of toxicokinetic and tissue distribution of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles vs free triptolide in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 713–717, 2012.
- YADAV, K.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Protein biomarker for psoriasis: A systematic review on their role in the pathomechanism, diagnosis, potential targets and treatment of psoriasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1796–1810, 2018.
- YAMAGUCHI, H. Non-Newtonian Fluid and Flow. In: **Engineering Fluid Mechanics**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. 85p. 399–496.
- YANG, J.; LIU, H.; ZHANG, X. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 804–817, 2014.
- YANG, M. et al. Development of triptolide-nanoemulsion gels for percutaneous administration: Physicochemical, transport, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2017.
- YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 8, p. 541–555, 15 ago. 2014.
- YOO, B. K. et al. Entrapment of curcumin into monoolein-based liquid crystalline nanoparticle dispersion for enhancement of stability and anticancer activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3119, jun. 2014.
- YOUNUS, M. et al. Incorporation of an Endogenous Neuromodulatory Lipid , Oleoylethanolamide , into Cubosomes : Nanostructural Characterization. 2016.
- YU, H.-P. et al. Oleic acid-based nanosystems for mitigating acute respiratory distress syndrome in mice through neutrophil suppression: how the particulate size affects therapeutic efficiency. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 25, 31 dez. 2020.
- YU, W. et al. Cellular uptake of poly(allylamine hydrochloride) microcapsules with different deformability and its influence on cell functions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 465, p. 149–157, 2016.
- YUAN, K. et al. Application and Mechanisms of Triptolide in the Treatment of Inflammatory Diseases—A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. December, p. 1–12, 6 dez. 2019.
- YUAN, Z. xiang et al. Renal-targeted delivery of triptolide by entrapment in pegylated TRX-20-modified liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5673–5686, 2017.
- ZABARA, A.; MEZZENGA, R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. **Journal of Controlled Release**, v. 188, p. 31–43, ago. 2014.
- ZHAI, J. et al. Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for the Next

- Generation of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 13, n. 6, p. 6178–6206, 25 jun. 2019.
- ZHANG, C. et al. Highly effective photothermal chemotherapy with pH-responsive polymer-coated drug-loaded melanin-like nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 1827–1840, mar. 2017a.
- ZHANG, L. et al. Fabrication of a triptolide-loaded and poly- γ -Glutamic acid-based amphiphilic nanoparticle for the treatment of rheumatoid arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2051–2064, 2018.
- ZHANG, P.; WU, M. X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 1, p. 173–180, 2018.
- ZHANG, Y.-Q. et al. Galactosylated chitosan triptolide nanoparticles for overcoming hepatocellular carcinoma: Enhanced therapeutic efficacy, low toxicity, and validated network regulatory mechanisms. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 15, n. 1, p. 86–97, jan. 2019.
- ZHANG, Y. et al. Dynamics and Morphology of Nanoparticle-Linked Polymers Elucidated by Nuclear Magnetic Resonance. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 22, p. 12399–12407, 21 nov. 2017b.
- ZHAO, E. et al. Surface engineering of gold nanoparticles for in vitro siRNA delivery. **Nanoscale**, v. 4, n. 16, p. 5102–5109, 2012.
- ZHAO, J.; STENZEL, M. H. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. **Polymer Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 259–272, 2018.
- ZHAO, X.; HUANG, Q.; JIN, Y. Gold nanorod delivery of LSD1 siRNA induces human mesenchymal stem cell differentiation. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 142–149, 2015.
- ZHEN, G. et al. Glycerol Monooleate-Based Nanocarriers for siRNA Delivery in Vitro. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2450–2457, 4 set. 2012.
- ZHENG, S. et al. Cytotoxicity of Triptolide and Triptolide loaded polymeric micelles in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1557–1567, 2011.
- ZHOU, T.; ZHOU, X.; XING, D. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4185–4194, abr. 2014.
- ZHOU, Z. L. et al. Triptolide: Structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 4, p. 457–475, 2012.

ANEXO(S)

Anexo 1 – Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 015/2020
kms

Ribeirão Preto, 02 de junho de 2020.

À pesquisadora
Ana Vitória Pupo Silvestrini
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado “Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNAs e triptolida no tratamento tópico da psoríase” (CAAE: 29151420.9.0000.5403 - Protocolo CEP/FCFRP nº 527), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 196ª reunião ordinária, realizada em 22/05/2020, conforme Parecer Consubstanciado nº 4.062.866.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, reading 'Cleni Mara Marzocchi Machado'.

Prof. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e Triptolida no tratamento tópico da psoríase

LOCAL: Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Bloco N (sala 19), da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto (FCFRP USP).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Vitória Pupo Silvestrini / Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

O senhor está sendo convidado a participar da pesquisa “Desenvolvimento e caracterização de nanodispersão de fase líquido-cristalina como sistema carreador multifuncional de siRNA TNF- α e Triptolida no tratamento tópico da psoríase” que está sendo desenvolvida pela aluna de mestrado Ana Vitória Pupo Silvestrini.

Com essa pesquisa buscamos estudar novas estratégias anti-inflamatórias para o tratamento da psoríase, uma doença inflamatória da pele. Para isso, separamos, do sangue humano, células de defesa que circulam no nosso corpo e estão envolvidas nos processos inflamatórios. O cultivo dessas células em laboratório nos permite colocá-las em contato com a formulação e avaliar se a mesma é capaz de reduzir a liberação de moléculas que causam inflamação.

Desta forma, solicitamos a sua colaboração para a coleta de 20 mL (2 colheres de sopa) de sangue venoso para o cultivo de células necessárias para os estudos acima mencionados. A coleta de sangue será solicitada uma única vez. Para participar é necessário que o senhor não tenha sido acometido por qualquer doença nos últimos 30 dias e não tenham utilizado qualquer anti-inflamatório nos últimos 7 dias.

Solicitamos também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto.

Informamos que o procedimento solicitado será realizado por profissional capacitado, de acordo com as boas práticas de laboratório e serão utilizados materiais limpos e descartáveis.

A região para coleta se dará de acordo com a facilidade de acesso aos vasos que circulam sangue venoso, e durante a picada da agulha um pequeno desconforto poderá ser sentido, e eventualmente hematoma no local após a coleta. Para qualquer manifestação de efeito adverso relacionado à coleta, os profissionais envolvidos são habilitados para prestar os devidos socorros de forma imediata.

Todo material utilizado para os ensaios será descartado após realizar as análises necessárias, e não será utilizado para outros projetos de pesquisa.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o senhor não é obrigado a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelas pesquisadoras.

Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum prejuízo ou penalidade.

Para desistir de participar ou para qualquer dúvida, basta entrar em contato com o pesquisador ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) nos telefones que aparecem no final deste documento. O CEP é responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Em caso de danos decorrentes da pesquisa o senhor tem o direito de procurar obter indenização. Se concordar em participar desta pesquisa, o senhor e o pesquisador assinarão duas vias desse documento, cada um ficará com uma via.

As pesquisadoras estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o senhor também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3315-4213 ou pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br.

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor.

Ana Vitória Pupo Silvestrini
Pesquisadora responsável

Eu, _____, portador do RG _____,
residente na _____, nº _____,
bairro _____, cidade _____, telefone _____, li e
concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do participante

Contato da pesquisadora: **Ana Vitória Pupo Silvestrini**. Telefone: (16) 33154302; Celular: (19) 981759992; E-mail: anapupo@usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (FCFRP-USP), Fone: (16) 3315-4213 ou e-mail: cep@fcfrp.usp.br