



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI - LIKA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA -
PPGNANOFARMA

VANDERVAL SILVA DE OLIVEIRA

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO DE ANDIROBA
(*Carapa guianensis* Aublet) CONTENDO TACROLIMUS PARA TRATAMENTO DA
PSORÍASE**

Recife
2019

VANDERVAL SILVA DE OLIVEIRA

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO DE ANDIROBA
(*Carapa guianensis* Aublet) CONTENDO TACROLIMUS PARA TRATAMENTO DA
PSORÍASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Pernambuco - PPGNanoFarma/UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Área de concentração: Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientador: Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Elaine Freitas, CRB4-1790

O48c Oliveira, Vanderval Silva de.
Carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (*carapa guianensis* aublet) contendo tacrolimus para tratamento da psoríase/ Vanderval Silva de Oliveira. – 2019.
204 f.: il.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em nanotecnologia farmacêutica. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices.

1. Nanossistema. 2. Hiperqueratose. 3. Lipídeos. 4. Imunossupressão. 5. Gel híbrido. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientadora). II. Título.

615.4 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 289)

VANDERVAL SILVA DE OLIVEIRA

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO DE ANDIROBA
(*Carapa guianensis* Aublet) CONTENDO TACROLIMUS PARA TRATAMENTO DA
PSORÍASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Pernambuco - PPGNanoFarma/UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em nanotecnologia farmacêutica.

Aprovada em: 09/09/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco / PPGNanofarma

Profa. Dra. Adriana Fontes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Ouro Preto - PPGNanofarma

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Ivanete Francelino Silva de Oliveira e Vanildo Silva de Oliveira, que na medida dos seus esforços souberam me conduzir durante esta vida, progredindo sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos profissionais invisíveis aos nossos olhos atentos à ciência, mas cegos às diferenças sociais, que chegam na madrugada para deixar tudo em ordem antes do nosso trabalho.

Aos meus familiares, principalmente irmãos (Valéria, Verônica, Vanusa e Vandeilton) e sobrinhos, pelo apoio, incentivo e carinho. Não posso deixar de incluir aqui dona Pedrina e Lúcia, avó e irmã de coração.

À professora Nereide Stela Santos Magalhães pela acolhida em seu grupo de trabalho, pela orientação e por ser essa mulher brilhante, sensível, temperamental absoluta, fortaleza...

Ao meu coorientador Francisco Humberto Xavier Júnior, sem sua ajuda esse trabalho não seria o mesmo. Agradeço imensamente pelas conversas, dicas e ajuda no delineamento desta tese.

Aos colegas de laboratório, em especial à Daniele Rocha e a Cibelly, que no decorrer dos trabalhos passamos a nos entender com nossas limitações e diferenças.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), especialmente a Rafael Padilha, Kilma, Regina, Fátima e Carmelita, cuja ajuda foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais pós-graduandos e pós-doutorandos do LIKA, meus agradecimentos pela ajuda prestada nos ensaios laboratoriais e empréstimo de materiais, além do coleguismo formado.

Aos amigos que compreenderam que os períodos de ausência eram dedicados aos estudos e conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica e das disciplinas que participei em outros programas de pós-graduação, aos técnicos e demais profissionais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, meu muito obrigado.

RESUMO

Psoríase é uma doença de pele imunomediada, com cerca de 4% de prevalência global, caracterizada por hiperproliferação dos queratinócitos, responsável por ativar os linfócitos T. Tacrolimus (Tac) é um fármaco imunossupressor que inibe o fator transcrição das células T. O óleo de andiroba (OA) possui diversas atividades farmacológicas com uma alta capacidade de inibir a migração de eosinófilos e a ativação de linfócitos T. Entretanto, o OA apresenta limitações sensoriais para aplicação tópica *in natura*. Desta forma, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) preparados com OA podem funcionar como sistema de liberação do Tac, melhorar a distribuição na pele, potencializar seu efeito e mascarar seu odor. Este trabalho teve o objetivo desenvolver CLN com OA contendo Tac para o tratamento da psoríase usando uma abordagem racional de desenho experimental. Estudos de pré-formulação foram realizados e a otimização dos CLN foi obtido usando o desenho fatorial do tipo Box-Behnken (BB). As variáveis independentes foram o OA, diestearato de glicerila (Pre), tensoativos polisorbato 80 (PS80) e Lipoid® E80 (LE80). Os CLN foram obtidos pela técnica de emulsificação (9500 rpm, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ e 3 min) e microfluidização (1000 bar e 5 ciclos). Tamanho de partícula (D), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) foram as variáveis dependentes. As respostas geradas foram tratadas estatisticamente. Tac foi encapsulado nos CLN e os sistemas foram caracterizados pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX), D, PDI, PZ, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e eficiência de encapsulação do Tac (EE%). CLN foram veiculados em biohidrogel e sua estabilidade avaliada. A permeação, retenção cutânea e distribuição dos CLN foram estudadas usando a pele da orelha de porco em células de Franz. A formulação adequada apresentou 9% de OA, 6% de Pre, 3% de surfactantes e 82% de água, com valores aproximados de D (140 nm), PZ (-27 mV) e EE (99%). Análises de DSC, FTIR e DRX não constatarem nenhuma incompatibilidade física ou físico-química entre os componentes da formulação e as mesmas mostraram-se estáveis a 4 e 25°C durante 90 dias. A MEV evidenciou CLN esféricos e bem individualizados. O Tac encapsulado apresentou maior retenção no estrato córneo ($20 \mu\text{g.cm}^{-2}$) e na pele remanescente ($13 \mu\text{g.cm}^{-2}$) que as demais formulações. O biohidrogel favoreceu a retenção do Tac na pele. Portanto, CLN a base de OA contendo Tac e veiculados em biohidrogel podem ser utilizados como promissores nanossistemas lipídicos de liberação controlada com potencial para terapia da psoríase.

Palavras-chave: Nanossistema. Hiperqueratose. Lipídeos. Imunossupressão. Gel híbrido.

ABSTRACT

Psoriasis is an immunomediated skin disease with about 4% global prevalence, characterized by keratinocytes hyperproliferation, responsible for activating T lymphocytes. Tacrolimus (Tac) is an immunosuppressive drug that inhibits T cells transcription factor. Andiroba oil (AO) has several pharmacological activities with a capacity to inhibit eosinophils migration and T lymphocytes activation. However, AO has sensory limitations for topical application in natura. In this way, nanostructured lipid carriers (NLC) prepared with AO can function as a Tac release system, improve skin distribution, enhance its effect and mask its odor. The goals of this work was to develop Tac-loaded NLC with AO for treatment of psoriasis using a rational approach to experimental design. Pre-formulation studies were performed and the NLC optimization was obtained using the Box-Behnken (BB) factorial design. Independent variables were AO, glyceryl distearate (Pre) and surfactants polysorbate 80 (PS80) and Lipoid™ E80 (LE80). NLC were obtained by emulsification technique (9500 rpm, $70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ and 3 min) and microfluidization (1000 bar and 5 cycles). Particle size (D), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) were the dependent variables. The generated responses were treated statistically. Tac-loaded NLC was characterized by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and drug entrapment efficiency (EE%). Tac-loaded NLC was carried on biohydrogel and the stability evaluated. Permeation, cutaneous retention and Tac-NLC distribution were studied using pig ear skin through the Franz cells. The appropriate formulation presented 9% AO, 6% Pre, 3% surfactants and 82% water, with approximate values of D (140 nm), PZ (-27 mV) and EE (99%). DSC, FTIR and XRD analyze found no physical or physicochemical incompatibility between the formulation components and they were stable at 4 and 25°C for 90 days. SEM showed spherical well individualized NLC. Encapsulated Tac showed greater retention in the stratum corneum ($20 \mu\text{g.cm}^{-2}$) and remaining skin ($13 \mu\text{g.cm}^{-2}$) than the other formulations. Biohydrogel favored the retention of Tac in the skin. Therefore, AO-based NLC Tac-loaded and delivered in biohydrogel can be offered as promising controlled release lipid nanosystems with increased potential for psoriasis therapy.

Key words: Nanosystem. Hyperkeratosis. Lipids. Immunosuppression. Hybrid gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura esquemática da pele-----	22
Figura 2 -	Estrutura esquemática das camadas da epiderme-----	23
Figura 3 -	Rotas intracelular (A), intercelular (B) e folicular (C) de absorção de moléculas através da pele-----	24
Figura 4 -	Célula de difusão vertical de Franz-----	27
Figura 5 -	Método de <i>tape stripping</i> (a) aplicação da formulação numa área marcada da pele; (b) distribuição homogênea; (c) a fita adesiva é pressionada com um rolo na pele, uma folha vazia de papel evita a transferência da formulação para o lado de trás da fita; (d) remoção da fita-----	28
Figura 6 -	Placas de psoríase-----	29
Figura 7 -	Imagem histopatológica de uma pele normal e uma pele com psoríase. Epiderme psoriática mostra acentuada acantose epidérmica, hiperqueratose e alongamento das cristas-----	30
Figura 8 -	Patogênese da psoríase-----	31
Figura 9 -	Estrutura molecular do tacrolimus-----	37
Figura 10 -	Mecanismo de ação do tacrolimus-----	40
Figura 11 -	Vantagens dos nanocarreadores em relação aos sistemas convencionais -	42
Figura 12 -	Estrutura dos nanocarreadores organizados em carreadores vesiculares, carreadores sólidos, carreadores micelares -----	43
Figura 13 -	Representação esquemática do arranjo molecular de polimorfos comuns dos triglicerídeos-----	53
Figura 14 -	Esquematização estrutural dos CLN: (A) imperfeito, (B) amorfo, (C) múltiplo-----	55
Figura 15 -	Efeito das nanopartículas lipídicas na pele-----	57
Figura 16 -	Ilustração da árvore de <i>C. guianensis</i> -----	73
Figura 17 -	Fruto da árvore de <i>C. guianensis</i> de onde se extrai o óleo das sementes--	74
Figura 18 -	Limonoides constituintes do óleo de andiroba-----	75
Figura 19 -	Óleo cru das sementes de andiroba-----	76
Figura 20 -	Combinação de hidrogel híbrido com nanopartícula lipídica e sua liberação da matriz polimérica-----	80
Figura 21 -	Diagrama da preparação de CLN por microfluidização-----	90

Figura 22 - Cromatograma do OA por CG-EM-----	106
Figura 23 - Fragmentos de massa do pico em 28,47 min do OA obtido por IE-----	106
Figura 24 - Fragmentos de massa do pico em 31,79 min do OA obtido por IE-----	107
Figura 25 - Fragmentos de massa do pico em 35,34 min do OA obtido por IE-----	107
Figura 26 - Termogramas de DSC do óleo de andiroba (OA), diestearato de glicerila (Pre) e mistura binária (MB)-----	111
Figura 27 - Espectros de FTIR-RTA do diestearato de glicerila (Pre), óleo de andiroba (OA) e mistura binária (MB)-----	112
Figura 28 - Fotografia dos CLN após segunda triagem da formulação-----	115
Figura 29 - Efeito da pressão do microfluidizador no tamanho de CLN-----	116
Figura 30 - Efeito do número de ciclos do microfluidizador no tamanho de CLN-----	117
Figura 31 - Fotografia das 15 formulações obtidas no planejamento experimental Box-Behnken-----	118
Figura 32 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas: D (a), PDI (b) e PZ (c) para o delineamento experimental Box-Behnken de CLN ---	120
Figura 33 - Gráficos de correlação linear entre os valores observados e previstos, correspondentes às diversas respostas: D (a), PDI (b) e PZ (c)-----	122
Figura 34 - Gráfico de superfície de resposta 3D mostrando o efeito das variáveis independentes no D de CLN. LT (Lipídeo Total), LL (Lipídeo Líquido) e SF (Surfactante)-----	123
Figura 35 - Tamanho das partículas de CLN da formulação otimizada obtida por DLS-----	126
Figura 36 - CLN obtido pela técnica de microfluidização após otimização-----	126
Figura 37 - CLN após encapsulação do Tac a 0,2% (2,0 mg/mL ou 11,11 mg/g da base anidra)-----	127
Figura 38 - Estrutura química do polisorbato 80 (Tween® 80): monoleato de sorbitano etoxilado 20 OE-----	129
Figura 39 - Estrutura química da fosfatidilcolina da gema do ovo (Lipoid® E80): 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina-----	129
Figura 40 - Microscopia eletrônica de varredura de CLN (a) e Tac-CLN (b) mostrando a distribuição regular e a forma esférica. Imagens captadas com ampliação de: a) 36600 X e b) 35400 X e a escala da barra medida em 1 µm. Em detalhe, mostrando a superfície lisa e uniforme. Imagens	

	captadas com ampliação de: a) 92000 X e b) 132000 X e a escala da barra medida em: a) 500 nm e b) 200 nm-----	131
Figura 41 -	Cromatograma do Tac obtido por CLAE em 5,198 min-----	132
Figura 42 -	Curva de calibração do Tac obtida por CLAE (n=3)-----	133
Figura 43 -	Termogramas de DSC do Tac, MB, CNL e Tac-CLN-----	136
Figura 44 -	Espectros de FTIR do Tac, MB, CLN e Tac-CLN-----	138
Figura 45 -	Difratograma de raios X do Tac, Pre, Tac-CLN e CLN-----	140
Figura 46 -	Dispersão polimérica entre o biohidrogel e a HEC a 1,0%-----	142
Figura 47 -	Aspecto visual das formulações de CLN e CLN/ZBP-HEC após centrifugação (n=3)-----	143
Figura 48 -	Resultados do teste gela/desgela de CLN e CLN/ZBP-HEC. (a) Tamanho (nm), (b) Potencial Zeta (mV) e c) pH. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, obtido pelo teste <i>t</i> de Student pareado (n=9)-----	145
Figura 49 -	a) Valores de tamanho (nm), potencial zeta (mV) e b) pH das formulações de CLN durante 90 dias de armazenamento nas temperaturas de 4, 25 e 40°C. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (n=9)-----	146
Figura 50 -	a) Valores de tamanho (nm), potencial zeta (mV) e b) pH das formulações CLN/ZBP-HEC durante 90 dias de armazenamento nas temperaturas de 4, 25 e 40°C. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (n=9)-----	147
Figura 51 -	Cromatograma do Tac após extração no homogenato de pele na concentração de 20 µg/mL-----	151
Figura 52 -	Quantidade de Tac que penetrou no EC e na PR da pele de orelha de porco após 24 h. Valores apresentados obtidos pela média ± DP de cinco experimentos individuais para cada formulação (n=5). ****, $p < 0,0001$ em comparação com Tac-CNL, Tac/ZBP-HEC e Tarfic®. ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas-----	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista de nanocarreadores contendo tacrolimus-----	66
Tabela 2 -	Codificação das variáveis e dos níveis no estudo da metodologia de superfície de resposta do planejamento experimental Box-Behnken-----	91
Tabela 3 -	Formulações aleatorizadas utilizadas para produção de CLN através do planejamento experimental do tipo Box-Behnken-----	91
Tabela 4 -	Formulação de CLN de OA contendo 2 mg/mL ou 11,11 mg/g (massa anidra) de Tac-----	92
Tabela 5 -	Composição do biohidrogel híbrido ZBP-HEC-----	93
Tabela 6 -	Composição dos ácidos graxos presentes no OA obtidos por CG-EM---	108
Tabela 7 -	Resultados de DSC do bulk lipídico e proporções da MB entre o OA e o Pre, com aumento da quantidade de OA de 10 a 90%, correspondendo a quantidades diminuídas de Pre de 90 a 10%. -----	110
Tabela 8 -	Triagem dos componentes da formulação de CLN-----	114
Tabela 9 -	Resultados de D e PDI após segunda triagem da formulação de CLN---	115
Tabela 10 -	Respostas observadas no desenho Box-Behnken para desenvolvimento e otimização das formulações de CLN com os valores preditos gerados pelo programa Statistica® 7.0-----	119
Tabela 11 -	Características das formulações de CLN e Tac-CLN-----	128
Tabela 12 -	Dados obtidos através da curva de calibração do Tac por CLAE-----	133
Tabela 13 -	Resultados de DSC do Tac, MB, CLN e Tac-CLN-----	135
Tabela 14 -	Resultados dos testes de seletividade nas matrizes utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> de permeação/penetração cutânea (Tac=20 µg/mL)-----	150
Tabela 15 -	Doseamento do Tac nas formulações usadas nos testes <i>in vitro</i> -----	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Tac	Tacrolimus
AO	Óleo de Andiroba
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
Pre	Diestearato de Glicerila (Precirol® ATO5)
D	Tamanho de partícula
PDI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial Zeta
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EE%	Eficiência de Encapsulação
EC	Etrato Córneo
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
EP	Epiderme
DE	Derme
NMF	<i>Natural Moisturizing Factor</i> (Fator Natural de Hidratação)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Th1	T <i>helper</i> tipo 1
FK506	Tacrolimus
FKBP-12	Imunofilina – Proteína de ligação do FK506
FKBP12-FK506	Complexo imunofilina com o FK506
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
m/m	massa/massa
HAP	Homogeneização a Alta Pressão
AGL	Ácidos Graxos Livres
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
IE	Impacto Eletrônico
u.a.m	unidade arbitrária de massa
MB	Mistura Binária

TG/DSC	Termogravimetria com Calorimetria Exploratória Diferencial
IC	Índice de Cristalinidade
ΔH	Entalpia de fusão
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
EHL	Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico
PS80	Polisorbato 80 (Tween® 80)
LE80	Fosfatidilcolina da gema do ovo (Lipoid® E80)
LT	Lipídeo Total (Pre e OA)
LL	Lipídeo Líquido (OA)
SF	Surfactantes (LE80 e PS80)
Tac-CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo tacrolimus
HEC	Hidroxietilcelulose
ZBP	Biopolímero da cana-de-açúcar (Biohidrogel)
CLN/ZBP-HEC	Biohidrogel híbrido contendo CLN
Tac-CLN/ZBP-HEC	Biohidrogel híbrido contendo Tac-CLN
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
v/v	volume por volume
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i> (peso molecular de corte)
PR	Pele Remanescente
X1	Lipídeo Líquido
X2	Lipídeo Total
X3	Surfactantes
Y1	Diâmetro
Y2	PDI
Y3	Potencial Zeta
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	PELE	21
2.1.1	Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i>	25
2.1.2	<i>Tape stripping</i>	28
2.2	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS: PSORÍASE	29
2.3	TRATAMENTO DA PSORÍASE	33
2.3.1	Tacrolimus	37
2.4	SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA	41
2.4.1	Nanosistemas inovadores	44
2.4.1.1	Lipossomas	44
2.4.1.2	Transfersomas	45
2.4.1.3	Proglisosomas	45
2.4.1.4	Etosomas	46
2.4.1.5	Niosomas	46
2.4.1.6	Novasomas	47
2.4.1.7	Emulsomas	48
2.4.1.8	Bilosomas	48
2.4.1.9	Eritrosoma	49
2.4.1.10	Nanopartículas magnéticas	50
2.4.1.11	Nanogéis	50
2.4.1.12	Nanopartículas lipídicas sólidas	52
2.4.1.13	Carreadores lipídicos nanoestruturados	53
2.4.2	Sistemas nanotecnológicos veiculando tacrolimus	57
2.4.3	Sistemas nanotecnológicos contendo tacrolimus para tratamento da psoríase	63
2.4.4	Preparação das nanopartículas lipídicas	68
2.4.4.1	Homogeneização a alta pressão	68
2.4.4.2	Emulsificação e evaporação do solvente	68
2.4.4.3	Ultrasonicação ou homogeneização a alto cisalhamento	69
2.4.4.4	Secagem por aspersão	70

2.4.4.5	Microfluidização-----	70
2.5	<i>Carapa guianensis</i> Aublet - ANDIROBA-----	72
2.6	HIDROGÉIS COM VEÍCULO PARA NANOSSISTEMAS-----	78
3	OBJETIVOS-----	84
3.1	GERAL-----	84
3.2	ESPECÍFICOS-----	84
4	MATERIAIS E MÉTODO-----	85
4.1	MATERIAIS-----	85
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA-----	85
4.2.1	Derivatização do óleo de andiroba-----	86
4.2.2	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas-----	86
4.3	ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE CLN-----	87
4.3.1	Efeito da mistura física dos lipídeos-----	87
4.3.1.1	Análise térmica-----	87
4.3.1.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier-----	88
4.3.2	Efeito dos constituintes da formulação-----	88
4.3.3	Efeito do processo de produção-----	89
4.4	PREPARAÇÃO DE CLN CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA-----	89
4.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CLN-----	90
4.6	FORMULAÇÕES DE CLN-----	92
4.6.1	Incorporação de tacrolimus em CLN-----	92
4.6.2	Produção do biohidrogel híbrido contendo Tac-CLN-----	93
4.7	CARACTERIZAÇÃO DE CLN-----	94
4.7.1	Análise térmica-----	94
4.7.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier-----	95
4.7.3	Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta--	96
4.7.4	Difração de raios X-----	96
4.7.5	Microscopia eletrônica de varredura-----	97
4.7.6	Determinação da eficiência de encapsulação de Tac-CLN-----	97
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES-----	98

4.9	PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DE TAC-CLN-----	99
4.9.1	Seletividade do método de extração e doseamento do tacrolimus frente a interferentes da formulação e da matriz biológica-----	99
4.9.2	Avaliação permeação/penetração dos Tac-CLN nas camadas da pele-----	101
4.9.3	Quantificação do tacrolimus no estrato córneo-----	102
4.9.4	Quantificação do tacrolimus na epiderme e derme-----	102
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS-----	103
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	104
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA-----	104
5.1.1	Derivatização do óleo de andiroba-----	104
5.1.2	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas-----	105
5.2	ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE CLN-----	109
5.2.1	Efeito da mistura física dos lipídeos-----	109
5.2.1.1	Análise térmica-----	110
5.2.1.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier-----	112
5.2.2	Efeito dos constituintes da formulação-----	113
5.2.3	Efeito do processo de produção-----	116
5.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CLN-----	118
5.4	PREPARAÇÃO DE CLN CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA-----	125
5.5	FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLN -----	127
5.5.1	Incorporação de tacrolimus em CLN-----	127
5.5.2	Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta--	128
5.5.3	Microscopia eletrônica de varredura-----	130
5.5.4	Determinação da eficiência de encapsulação de Tac-CLN-----	132
5.5.5	Análise térmica-----	135
5.5.6	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier-----	138
5.5.7	Difração de raios X-----	139
5.5.8	Produção do biohidrogel híbrido ZBP-HEC-----	141
5.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES-----	143

5.7	PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DE TAC-CLN-----	149
5.7.1	Seletividade do método de extração e doseamento do tacrolimus frente a interferentes da formulação e da matriz biológica-----	149
5.7.2	Avaliação da permeação/penetração e retenção cutânea <i>in vitro</i> -----	152
6	CONCLUSÃO-----	162
	REFERÊNCIAS-----	164
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DO TACROLIMUS EM ACETONITRILA (20 µg/mL)-----	199
	APÊNDICE B – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO DE ANDIROBA (CLN) (20 µg/mL)-----	200
	APÊNDICE C – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NO BIOHIDROGEL HÍBRIDO (ZBP-HEC) (20 µg/mL)-----	201
	APÊNDICE D – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NO ESTRATO CÓRNEO (EC) (20 µg/mL)-----	202
	APÊNDICE E – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NA PELE REMANESCENTE (PR) (20 µg/mL)-----	203
	APÊNDICE F – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NA FITA ADESIVA (40 µg/mL)-----	204

1 INTRODUÇÃO

Psoríase é uma desordem inflamatória crônica, recidivante, imunomediada, com envolvimento primário da pele e uma forte predisposição genética, não transmissível, dolorosa, desfigurante e incapacitante para a qual não há cura, e com grande impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes (LONNBERG et al., 2014). A prevalência da psoríase é variável entre 0,09% e 11,4%, o que torna a psoríase um problema global sério. No Brasil, a estimativa da prevalência chega a 1,3% da população (WHO, 2016).

Um repertório de tratamento tópico e sistêmico está disponível para a remissão da psoríase, tais como os análogos da vitamina D3, corticosteroides, alcatrão, ditranol, fototerapia, metotrexato, ciclosporina, retinoides sistêmicos, imunossupressores como os inibidores de calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus) e produtos imunobiológicos (etanercepte, adalimumabe, infliximabe, golimumabe, ustekinumabe e o secukinumabe) (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Tacrolimus é um macrolídeo imunossupressor, isolado a partir do caldo de fermentação de *Streptomyces tsukubaensis*, eficaz em terapia de emergência ou imunossupressão primária e para as condições imunoinflamatórias tópica, incluindo dermatite atópica e psoríase. Ele inibe a ativação das células T no início de transcrição do gene, através do bloqueio da fosfatase (calcineurina) (POPLE; SINGH, 2010).

O veículo convencional para aplicação tópica do tacrolimus, embora seja eficaz, é uma forma farmacêutica semissólida lipofílica, de elevada viscosidade, pegajosa e quando aplicada sobre a pele apresenta um sensorial que causa pouca adesão ao tratamento. Não assegura a liberação tópica adequada do fármaco ao local alvo. A maioria dos estudos com pomada de tacrolimus tem relatado uma baixa penetração nas camadas da pele. Além disso, apresenta alguns efeitos colaterais, como irritação (ardor, queimação e prurido) (POPLE et al., 2010). A redução completa da psoríase não é obtida usando este tipo de tratamento, portanto, várias estratégias nanotecnológicas são consideradas pelos pesquisadores para minimizar o quadro patológico desta doença (GARG; RATH; GOYAL, 2016).

Carapa guianensis Aublet é uma árvore conhecida popularmente no Brasil como andiroba, pertencente à família das Meliaceae, rica em limonoides, responsáveis pelas ações farmacológicas. Os usos etnofarmacológicos do óleo de andiroba incluem o tratamento de dores artríticas, infecções de ouvido e doenças da pele, incluindo psoríase. Estudos demonstraram que o óleo possui atividades anti-inflamatória, analgésica, antialérgica e imunomoduladora (COSTA-SILVA et al., 2007, 2008; FERRARIS et al., 2011, 2012; HENRIQUES; JESUS et

al., 2017; PENIDO, 2014; PENIDO et al., 2005). O uso do óleo de andiroba vem despertando grande interesse da indústria farmacêutica e cosmética, por ser fazer parte da biodiversidade e sustentabilidade de comunidades da Amazônia Legal. O óleo pode funcionar como componente da forma farmacêutica, já sendo utilizado na produção de micropartículas poliméricas, emulsões, emulsões com cristais líquidos e nanoemulsões, assim como atuar como princípio ativo, sendo apontado como um promissor produto para diversas aplicações tecnológicas e farmacológicas (BALDISSERA et al., 2013; FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SENHORINI et al., 2012).

No desenvolvimento de medicamentos destinados à via tópica, a taxa de penetração é fator importante para determinar o seu regime e dosagem. A diminuição da concentração pode contribuir para reduzir os efeitos adversos, mas reduz a sua ação. Neste contexto, o uso de nanopartículas lipídicas obtidas com o óleo de andiroba, um produto natural, seguro, biodegradável, eficaz tem sido investigada como um potencial sistema para transporte de fármacos através da pele (NAM; JI; PARK, 2011).

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) desperta grande interesse para a aplicação cutânea por controlar a liberação de ativos, incluir lipídeos naturais ou sintéticos biodegradáveis, possuir excelente tolerabilidade e boa resposta farmacológica. Seu tamanho está dentro da escala nanométrica (40 a 1000 nm), não requer o uso de solventes orgânicos, seu desenvolvimento pode ser realizado a um custo menor e são facilmente transpostos para escalas maiores de produção (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). As vantagens dos carreadores lipídicos nanoestruturados incluem a proteção de compostos quimicamente lábeis, aumento da capacidade de incorporação de princípios ativos, uma quantidade inferior no teor de água na suspensão de partículas, baixa expulsão do fármaco durante o armazenamento e, devido o seu tamanho, assegura um maior contato com o estrato córneo aumentando a penetração do fármaco na pele (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

A encapsulação do tacrolimus em carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba pode ser um promissora tecnologia para superar algumas limitações da forma farmacêutica usual deste fármaco no tratamento da psoríase, melhorando a penetração cutânea e aumentando os níveis do ativo em camadas profundas da pele, assim como a redução de efeitos secundários da pomada (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018; PROW et al., 2011; PURI et al., 2009).

O propósito deste trabalho foi desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus e dispersos em um biohidrogel como estratégia de dupla encapsulação para tratamento tópico da psoríase. A inovação deste trabalho está na utilização

do óleo de andiroba, um produto natural com propriedades anti-inflamatória, antialérgica, imunomoduladora e atóxico, como matéria-prima para a formação de CLN. Assim como um possível potencializador dos efeitos farmacológicos do tacrolimus, inibindo a migração de linfócitos T e redução do ardor e prurido intensos deste fármaco, quando aplicado na forma de pomada, inibindo as vias de sinalização inflamatória e alérgica. Além disso, espera-se que este produto dermatológico seja estável e com propriedades específicas para superar a baixa taxa de penetração do Tac na pele, realizando a sua liberação na junção dermoepidérmica, chegando aos linfócitos T, células dendríticas e mastócitos, melhorando a sua eficácia terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão está dividida em itens e subitens que abordarão temas relevantes para a compreensão do estado da arte do objetivo central, que são os carreadores lipídicos nanoestruturados a base de lipídeos naturais para o uso tópico no tratamento da psoríase.

Inicialmente será apresentada uma breve descrição da pele e os aspectos histofisiológicos, passando para os estudos de permeação cutânea *in vitro* e a técnica de *tape stripping*. Subsequentemente, a psoríase será retratada através dos seus aspectos imunohistopatológicos e os diversos tratamentos utilizados para esta patologia, dando ênfase ao fármaco imunossupressor tacrolimus.

Nos itens seguintes, serão abordados os sistemas nanotecnológicos para aplicação tópica e a apresentação de nanosistemas inovadores descritos na literatura, culminando com os carreadores lipídicos nanoestruturados, os nanosistemas contendo o fármaco tacrolimus e finalizando este item com a revisão sistemática dos nanosistemas veiculando tacrolimus, mais especificamente para o tratamento da psoríase. Seguindo a linha de raciocínio, será feita uma breve descrição das técnicas de preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

Posteriormente às abordagens fisiopatológicas, farmacológicas e tecnológicas que envolvem à psoríase, um tópico de revisão explorará a espécie *Carapa guianensis* Aublet (andiroba), o seu óleo, seus constituintes químicos e seus usos terapêuticos. A revisão finalizará com a abordagem teórica sobre biohidrogéis usados como veículos para nanosistemas.

2.1 PELE

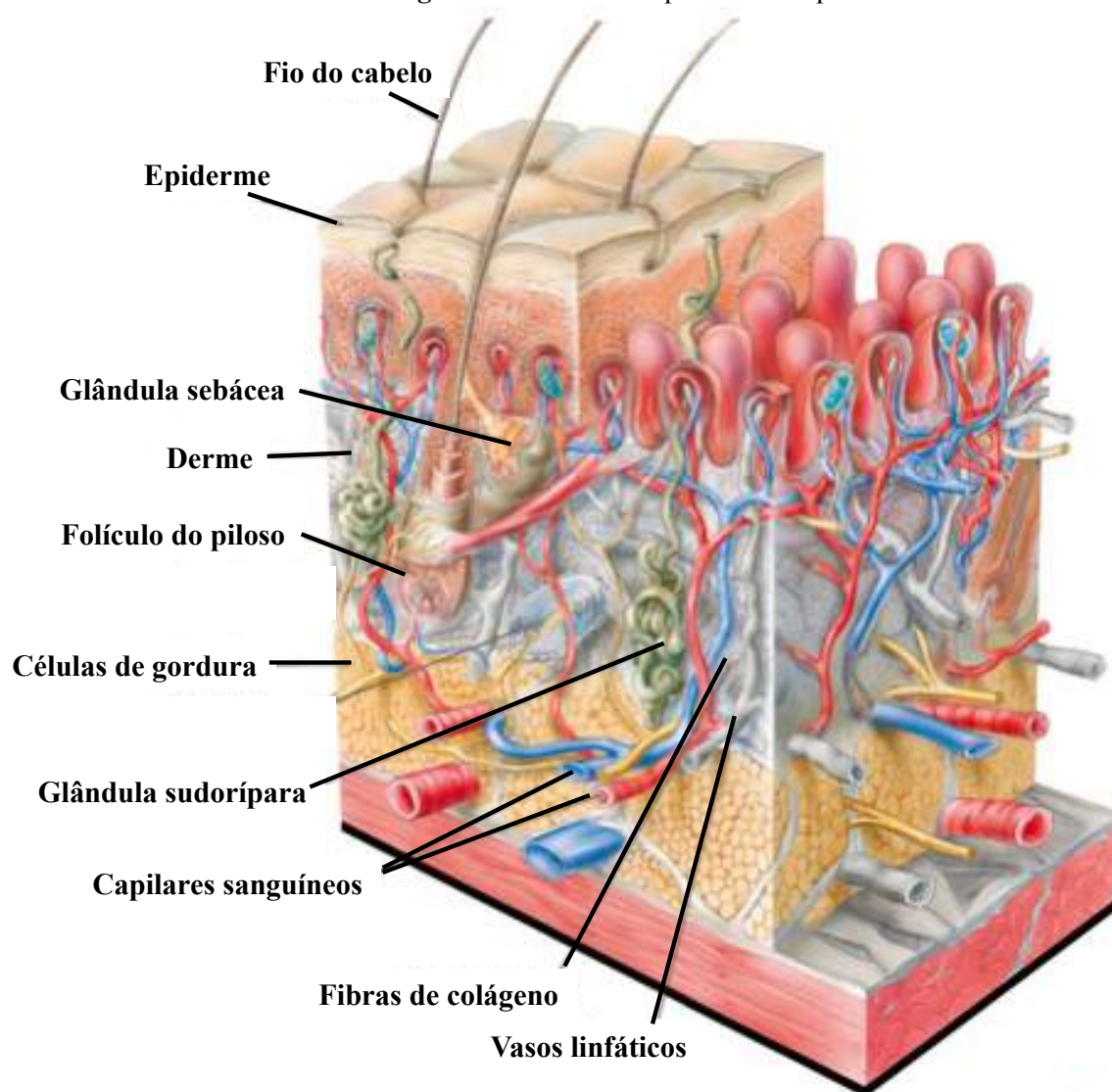
A pele é o maior órgão do corpo humano correspondendo à cerca de 5% do seu peso total. Entre as múltiplas funções complexas da pele, um de seus papéis principais é o de evitar a invasão de agentes externos, agindo como uma barreira defensiva às ameaças do ambiente exterior (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

A pele possui mecanismos de defesa que lhe conferem barreiras de proteção física, imunológica e metabólica, mas também pode ser utilizada como uma porta de entrada para substâncias terapêuticas, tais como fármacos e vacinas, se os mecanismos que conferem as propriedades de barreira forem entendidos e explorados (PROW et al., 2011; BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014; GARCÊS et al., 2018).

De acordo com a figura 1, a pele humana é estruturada histologicamente em duas camadas: a epiderme (EP), mais externa e de origem ectodérmica; a derme (DE), mais interna

e de origem mesodérmica, e logo abaixo da derme existe um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado hipoderme ou camada subcutânea (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Figura 1 - Estrutura esquemática da pele.



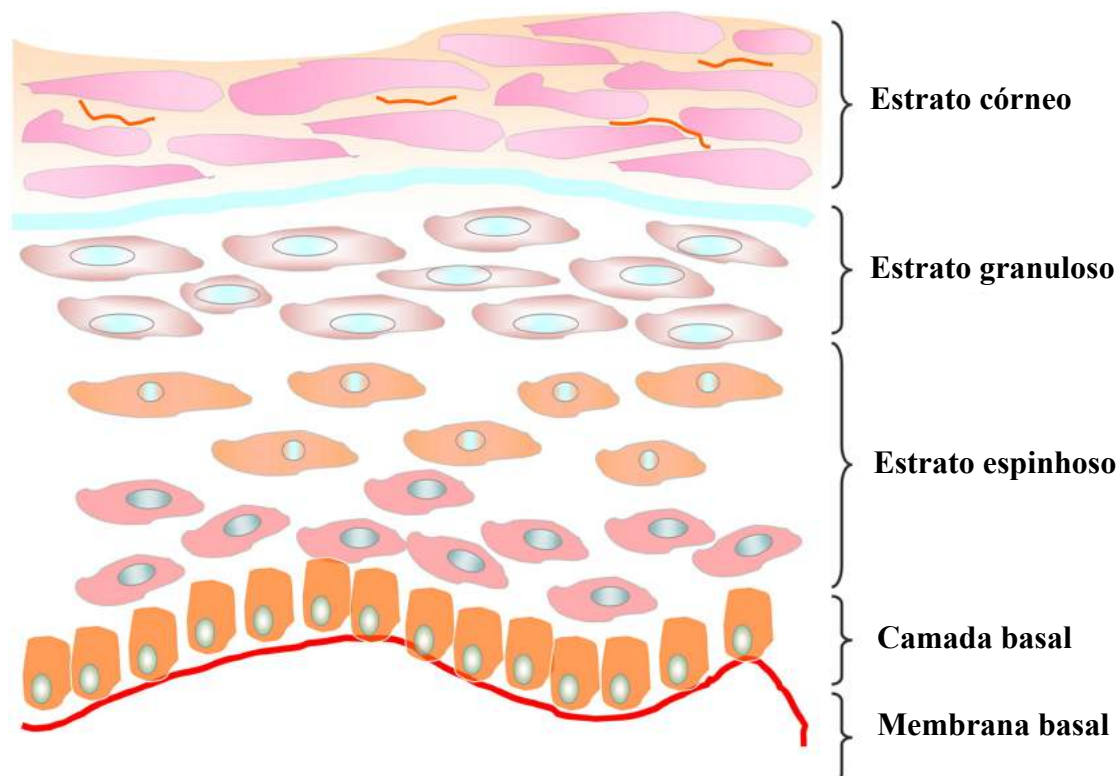
Fonte: Adaptado de <https://bit.ly/31MNtVs>.

A epiderme é um tecido em constante renovação, constituído por um epitélio estratificado pavimentoso dividido em várias camadas conhecidas como estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (figura 2) (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Na camada epidérmica, os queratinócitos se encontram em constante divisão e migram para a superfície da pele, sucessivamente, para formarem as camadas mais externas, perdem o

núcleo e sofrem alteração na sua composição lipídica (PROW et al., 2011). Essa alteração confere ao estrato córneo permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das membranas biológicas. Essa impermeabilidade é considerada um problema para os usos de produtos cutâneos, pois se estima que apenas uma pequena porcentagem de material ativo permeie através da pele quando aplicado topicamente (PROW et al., 2011; BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014).

Figura 2 - Estrutura esquemática das camadas da epiderme.



Fonte: Adaptado de Zhai; Zhai, 2014.

A camada mais superficial da EP, a córnea ou EC, é a principal barreira de proteção da pele e também para o transporte de fármacos (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; CEVC; VIERL, 2010). É composta por células mortas (corneócitos) repletas de queratina, substância cerosa (colesterol, aminoácidos, polipeptídeos e derivados lipídicos) (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; CEVC; VIERL, 2010).

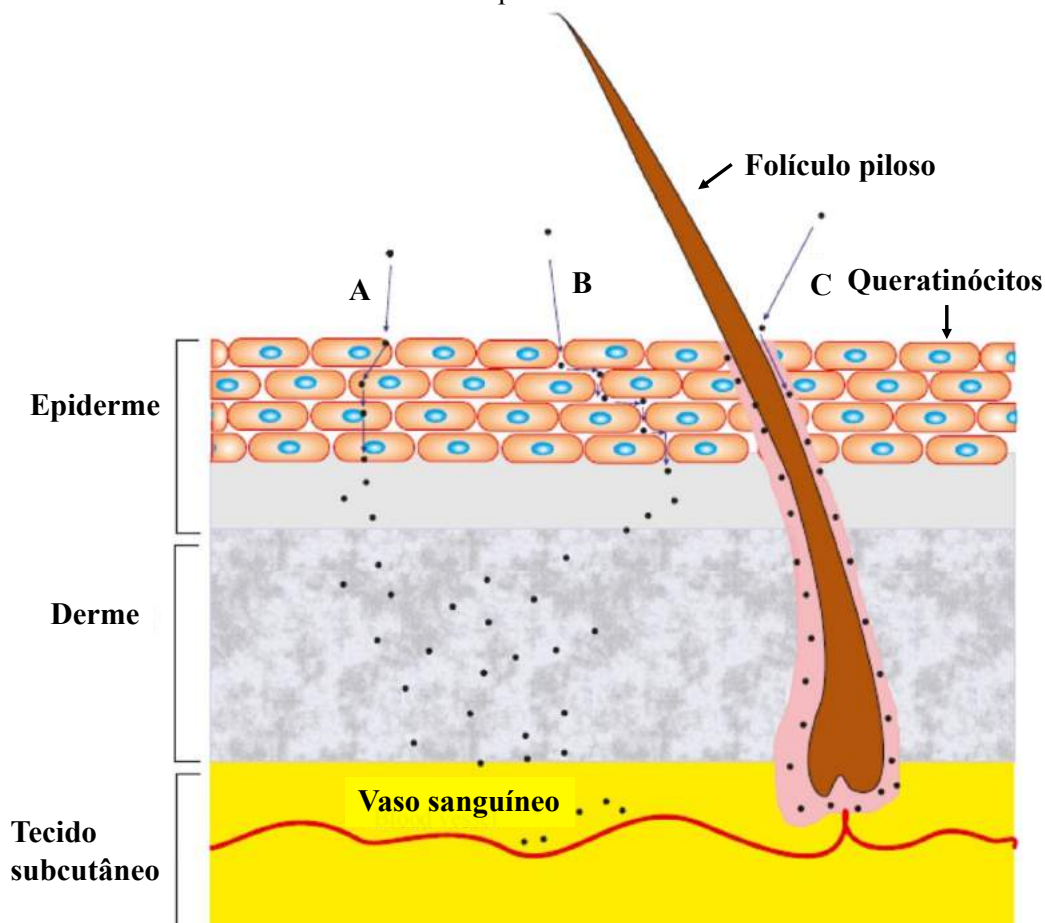
Depois que uma molécula ativa atravessa o EC (espessura de 75 a 150 μm), não há outra barreira à difusão nas outras camadas da pele se a molécula não ficar retida ou metabolizada no caminho (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Todavia, a pele exerce função barreira através do EC a qual influencia a taxa de absorção/penetração de substâncias, juntamente com outros fatores como área de contato,

duração da exposição, integridade do EC e espessura da EP; ainda há aqueles fatores relacionados à molécula como lipofilicidade/hidrofiliicidade, peso molecular, concentração e finalmente, tipo da formulação que veicula a molécula (KARADZOVSKA et al., 2013; CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

A permeação de substâncias através da pele pode ocorrer por difusão da substância ativa através da EP intacta ou através dos apêndices da pele, como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Esses caminhos pelos quais as moléculas podem atravessar o EC são: intracelular (figura 3-A), intercelular (figura 3-B) e folicular (figura 3-C) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; HARDGRAFT, 2001; CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Figura 3 - Rotas intracelular (A), intercelular (B) e folicular (C) de absorção de moléculas através da pele.



Fonte: Adaptado de Khezri; Saeedi; Dizaj, 2018.

A via intercelular se dá pelas lamelas lipídicas que rodeiam os corneócitos. A via folicular acontece através de folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, os quais servem como via de acesso rápido de curto prazo, assim como as glândulas sudoríparas para a

DE profunda. A via intracelular ocorre pelos corneócitos preenchidos de queratina e lamelas lipídicas compostas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres.

Encontrado exclusivamente no EC, o NMF (*Natural Moisturizing Factor*), conhecido como fator natural de hidratação, consiste principalmente de aminoácidos e seus derivados, como o ácido pirrolidocarboxílico e outros componentes, como ácido urocânico, ácido láctico, ureia, citrato e açúcares (SEGRE, 2006). NMF encontra-se em maior concentração nos corneócitos, por isso conseguem reter maior quantidade de água (SEGRE, 2006). Em estados patológicos cutâneos, constata-se a ausência de NMF em conjunto com anormalidades associadas ao EC. Nos casos de psoríase, há ausência de NMF e as manifestações são diferenciação anormal dos queratinócitos, provocando rachaduras severas e escamação da pele (SEGRE, 2006; BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014).

A homeostasia do EC é responsável pela restrição na perda de água para o ambiente externo. A locomoção normal da água através do EC para a atmosfera é conhecida como perda transepidérmica de água (PTEA) (SEGRE, 2006; BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014). O comprometimento do EC eleva a perda de água podendo aumentar o risco de lesões na pele, induzir a liberação de citocinas e com isso resultar em processo inflamatório e eczema (SEGRE, 2006; BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014).

2.1.1 Estudo de permeação cutânea *in vitro*

Há um grande esforço da comunidade científica no desenvolvimento e aprimoramento de ensaios *in vitro* que permitam boas comparações e correlações com o desempenho de fármacos e perfis do sistema de liberação *in vivo* na pele humana. Eles são importantes não só para avaliação da eficácia dos produtos, mas principalmente por uma questão de segurança (LEMOS et al., 2018).

O uso de ensaios *in vitro* permite que um grande número de diferentes formulações seja avaliado em tempo e custo razoáveis. Por meio deles é possível alcançar uma boa reprodutibilidade dos resultados e controle de parâmetros específicos; compostos tóxicos podem ser avaliados e não há necessidade de aprovação ética (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012). Vale citar também a importância dos ensaios de retenção e permeação cutânea *in vitro* para atendimento ao Regulamento Europeu (RE) número 1223/2009 (REGULATION EC, 2009). No caso de substâncias cujos dados de exposição sistêmica não estejam disponíveis, faz-se fundamental a condução destes ensaios para evidenciar a não permeação do ingrediente em questão para a circulação sistêmica (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

A permeação cutânea tem sido conceituada como a passagem de ingredientes de formulações aplicadas na pele através da camada córnea. Na maioria das vezes, a permeação cutânea não pode ser evitada, entretanto pode ser modificada pelos ingredientes da formulação, por se tratar de uma interação físico-química entre dois sistemas (produto e membrana de absorção) modulados por uma barreira (camada córnea) (MARWAH et al., 2016).

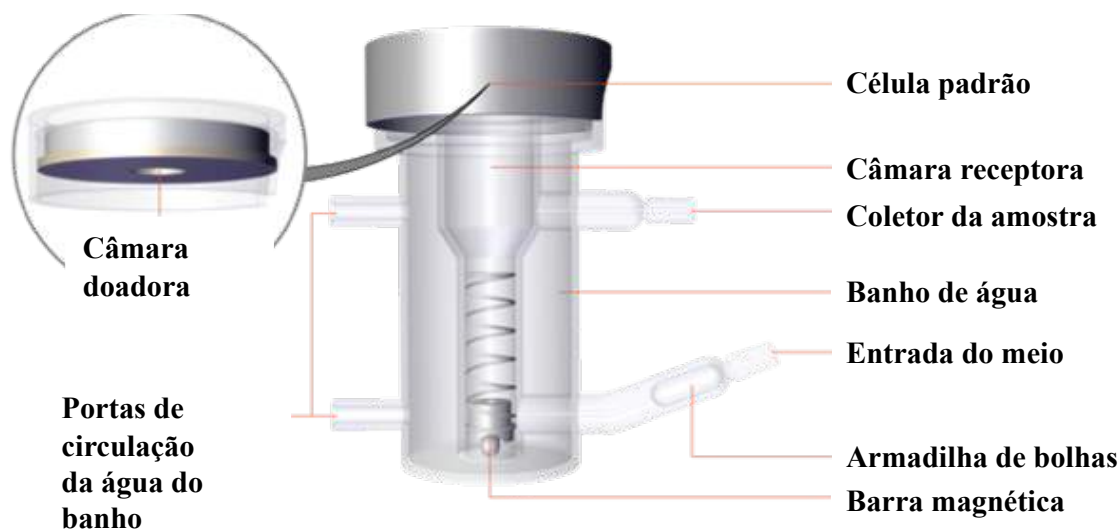
A presença de adjuvantes na formulação como promotores de absorção cutânea (alteradores da permeabilidade cutânea) e veiculação de ativos em sistemas de liberação (lipossomas, nanopartículas, nano e microemulsões, etc.) influenciam o grau de penetração/permeação cutânea do ingrediente ativo (LEMOS et al., 2018). Além destes fatores, a penetração/permeação cutânea dependerá do tempo de contato do produto com a pele, da concentração dos ingredientes estudados e da área de contato, conforme descrito pela Lei de Fick. Como modelo experimental *in vitro* e *in vivo* de penetração/permeação para formulações cosméticas, os estudos devem ser realizados em modelo de pele íntegra (ANVISA, 2012; LEMOS et al., 2018).

A literatura científica descreve métodos *in vitro* que mimetizam o processo de liberação e penetração transdérmica *in vivo* com e sem membranas. Diferentes tipos de células de difusão, das quais a célula de difusão vertical do tipo Franz (figura 4) em sistema estático e fluxo contínuo, tem sido a mais empregada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade, tanto para adesivos transdérmicos como para formas farmacêuticas semissólidas, bem como cosméticos, pesticidas e oftálmicos (BENSON; WATKINSON, 2012). Conforme o *Food and Drug Administration* (FDA), *Guideline* SUPAC SS, este sistema é ideal para controle de qualidade de preparações tópicas (FDA, 1997; OECD, 2004a).

O sistema consiste em um compartimento doador e um compartimento receptor, que são separados por uma membrana sintética ou pele. A pele dermatomizada da orelha do porco é a mais amplamente utilizada devido a semelhança com a estrutura da pele humana (JACOBI et al., 2007). Esse ensaio é internacionalmente validado e aceito (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2016).

A célula de difusão vertical de Franz, nome em homenagem ao seu inventor, é um dispositivo de vidro, usado para avaliar a liberação, retenção e permeação de fármacos através da pele. Uma quantidade de formulação a ser estudada é aplicada sobre a membrana, mimetizando as condições *in vivo*. O volume do compartimento receptor é relativamente grande para garantir solução homogênea e diluição da substância permeada (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; FRANZ, 1978; LEMOS et al., 2018).

Figura 4 - Célula de difusão vertical de Franz.



Fonte: <https://files.hansonresearch.com/wp-content/uploads/2015/03/VDC-Callouts-Title-e1440705223957.png>.

O fluido receptor, que deve ter uma capacidade adequada para solubilizar o fármaco no ensaio, é mantido em contato com o lado de baixo da pele/membrana desde o momento da aplicação até o final da coleta do fluido receptor. O controle da temperatura do fluido receptor é crucial durante todo o experimento. A temperatura da superfície da pele na célula de difusão deve ser mantida na mesma temperatura da pele *in vivo* ($32 \pm 1^\circ\text{C}$) (SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001).

Geralmente, para moléculas hidrofílicas, utiliza-se tampão fosfato como solução receptora, já para moléculas lipofílicas utiliza-se soluções com tensoativos em quantidades que não devem interferir com a integridade da membrana. Como regra geral, a solução receptora deve ter um pH fisiológico. Com o intuito de obedecer à condição *sink*, a quantidade de substância perfundida no fluido receptor não deve exceder 10% do seu nível de saturação a qualquer momento, a fim de minimizar a interferência com o processo de difusão livre que poderia produzir uma subestimação da absorção dérmica (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

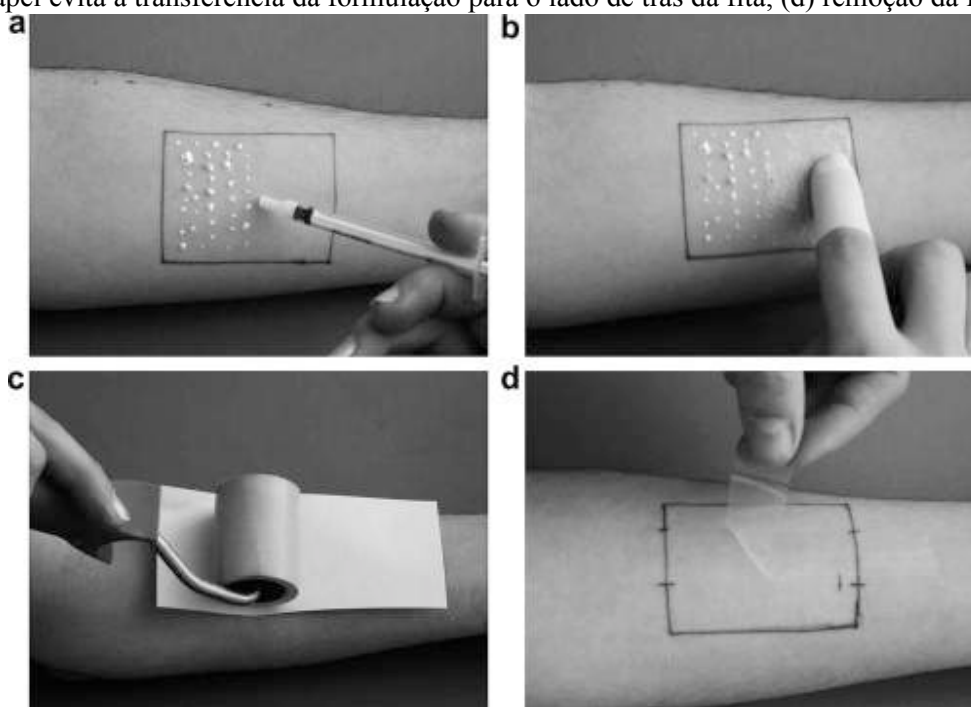
A difusão do fármaco ocorre por gradiente de concentração, através da membrana ou pele, para uma solução receptora onde será realizada a determinação analítica do conteúdo de fármaco permeado ao longo do tempo. Os resultados obtidos podem ser considerados para o estudo dos mecanismos de alergia e irritação cutânea. Do mesmo modo, efeitos toxicológicos sistêmicos estão intimamente ligados ao grau de penetração/permeação cutânea (ANVISA, 2012).

A avaliação da penetração de fármacos na pele é importante no desenvolvimento de formulações tópicas, pois o efeito esperado é direcionado para as camadas superficiais da pele. As concentrações de fármaco nas camadas da pele podem ser determinadas por ensaios *in vitro* e *in vivo*, tais como através da realização de estudos de retenção cutânea utilizando a técnica de *tape stripping* (PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

2.1.2 *Tape stripping*

O *tape stripping* é um método simples e eficiente bem estabelecido para investigar a penetração de substâncias aplicadas topicamente e dessa forma a eficácia de formulações cosméticas e dermatológicas (figura 5) (KLANG et al., 2012; MAHRHAUSER et al., 2015).

Figura 5 - Método de *tape stripping* (a) aplicação da formulação na área marcada da pele; (b) distribuição homogênea; (c) a fita adesiva é pressionada com um rolo na pele, uma folha vazia de papel evita a transferência da formulação para o lado de trás da fita; (d) remoção da fita.



Fonte: LADEMANN et al., 2009.

Após aplicação do produto e penetração das formulações, as camadas de células superficiais do EC são sucessivamente removidas da mesma área da pele com fitas adesivas, que são subsequentemente analisadas quanto ao conteúdo de fármacos por métodos analíticos clássicos. Assim, a quantidade de fármaco penetrado e a profundidade de penetração na pele

podem ser determinadas. Em experimentos de fita adesiva, a orelha suína mostrou ser um substituto adequado da pele humana (KLANG et al., 2012).

2.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS: PSORÍASE

Psoríase (do grego *psora*, que significa: prurido, coceira) é uma desordem inflamatória crônica, imunomediada, que se manifesta na pele e/ou articulações, considerada como uma das doenças mais comuns na pele humana e com peça chave em bases genéticas importantes (LONNBERG et al., 2014; PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013; RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014). Na pele, caracteriza-se por prurido, vermelhidão, placas eritematosas de coloração cinza a branca (figura 6), queratinócitos hiperproliferados e com diferenciação anormal, levando a hiperplasia da EP, infiltração de linfócitos T ativados e dilatação dos capilares sanguíneos. O *turnover* celular dos queratinócitos é de 28 a 30 dias e na psoríase é de 3 a 5 dias, fazendo com que ocorra uma descamação prematura do EC (GEUSENS et al., 2009; JAKOBSEN et al., 2009).

Figura 6 - Placas de psoríase.



Fonte: Spring 2017, NIH MedlinePlus.

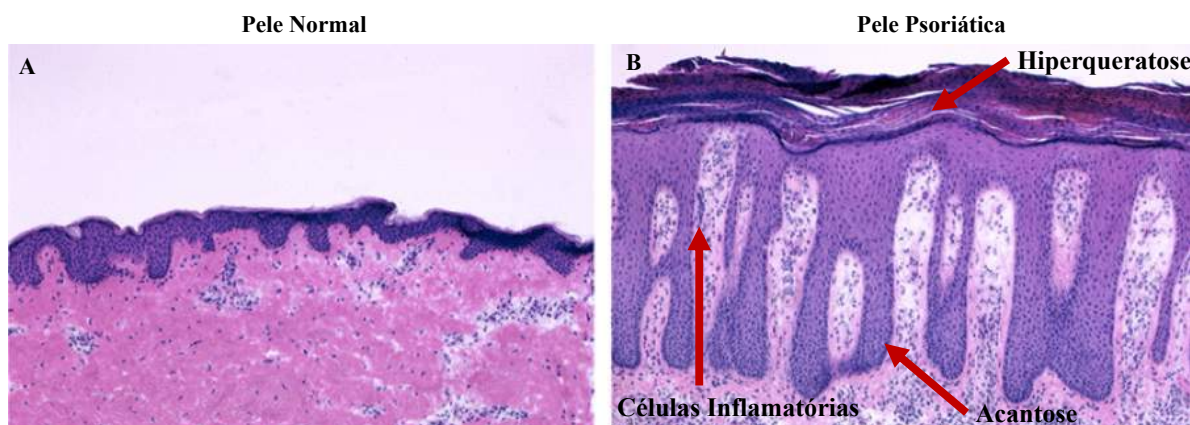
Existem duas idades de pico de início da psoríase: entre 15 e 30 anos e 50 e 60 anos. O fenótipo clínico mais comum da psoríase é a psoríase vulgar (que afeta 85% a 90% dos pacientes), caracterizada por placas eritematosas e descamativas. A maioria das pesquisas até o momento explora o início precoce (antes dos 40 anos) da forma dessa doença chamada

psoríase tipo 1. Outros subtipos incluem psoríase tipo 2 (início após os 40 anos), psoríase gutata, psoríase ungueal e variantes pustulares (MAHIL; CAPON; BARKER, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a psoríase ocorre em média em 4,6% da população mundial, mas com prevalência diferenciada entre determinadas populações, regiões geográficas e grupos étnicos, e está associada com significantes comorbidades, que incluem a poliartrite inflamatória, doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, doença de Crohn, linfoma e desordens psiquiátricas, como ansiedade, depressão, as quais afetam a qualidade de vida dos pacientes devido ao desconforto físico, imagem negativa do corpo, limitações nas atividades diárias, contatos sociais e de trabalho (LI; ARMSTRONG, 2012; WHO, 2016).

O diagnóstico da psoríase é baseado na apresentação clínica, necessitando eventualmente de biópsia da pele para confirmação. As alterações relevantes que são observadas na EP incluem a acantose (aumento do número de queratinócitos e espessamento da camada espinhosa), perda da camada granular, paracetose (disfunção do processo de cornificação que mantém queratinócitos nucleados na camada córnea) e hiperqueratose (espessamento da camada córnea) (figura 7) (GREB et al., 2016; SATHE et al., 2019).

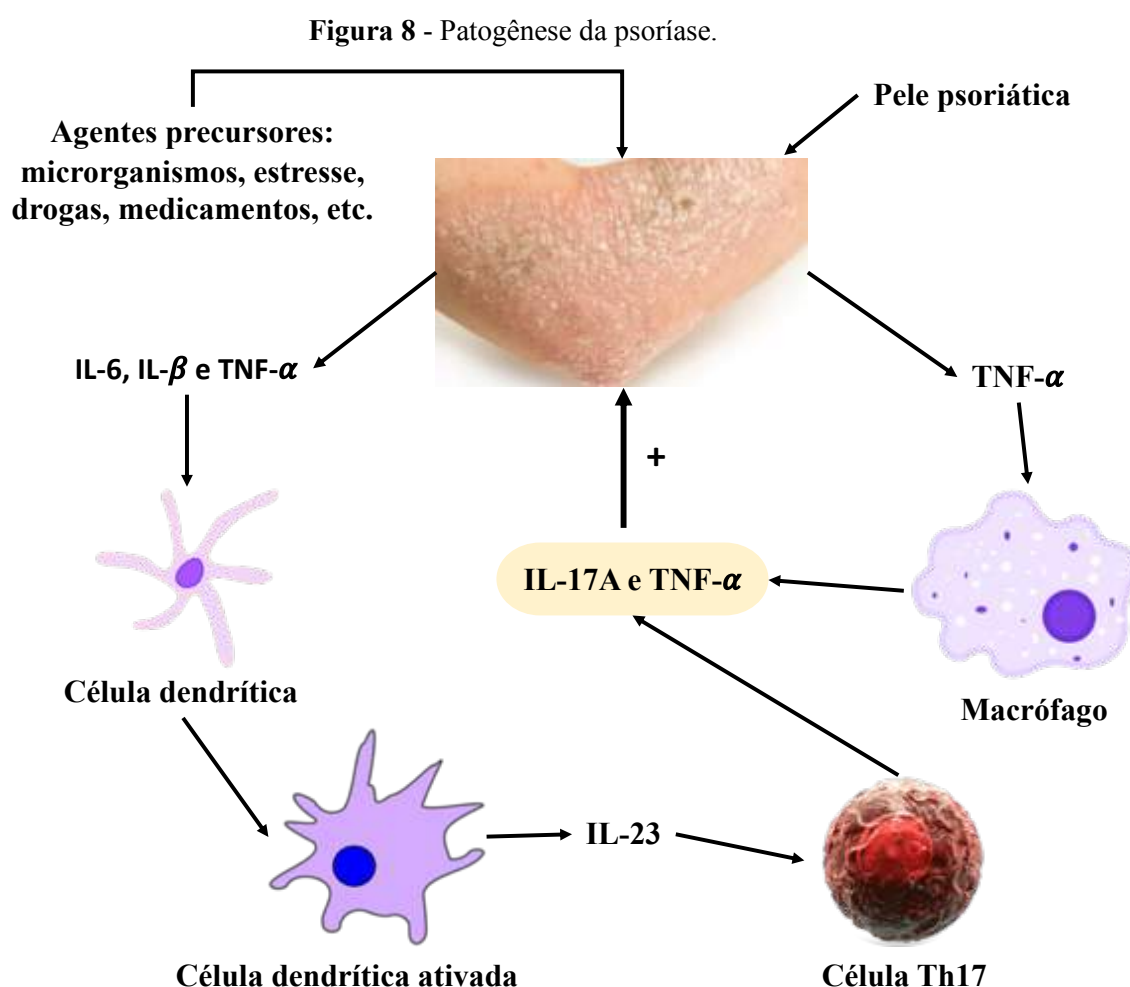
Figura 7 - Imagem histopatológica de uma pele normal (A) e uma pele com psoríase (B). Epiderme psoriática mostra acentuada acantose epidérmica, hiperqueratose e alongamento das cristas.



Fonte: https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1157602/000110465915080063/a15-23637_2ex99d1.htm.

Outra característica histopatológica é o aumento da quantidade e a dilatação de vasos sanguíneos na DE, que permitem a maior migração de células imunológicas aos locais afetados mantendo o ciclo da doença ativo (figura 7) (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; KRUEGER; BOWCOCK, 2005; SCHÖN; BOEHNCKE, 2005).

A psoríase é mediada pelos linfócitos T e se caracteriza por lesões eritematoescamosas que podem comprometer apenas os joelhos e cotovelos, mas podem também envolver as faces extensoras dos membros, o tronco e o couro cabeludo, comprometendo também as unhas e as articulações (GREB et al., 2016). A tríade formada pela diferenciação epidérmica anormal com hiperproliferação queratinocítica, a inflamação imunológica mediada por linfócitos T e um ambiente genético com herança poligênica promovem as alterações que caracterizam a patogênese da psoríase (figura 8) (DAUDÉN, et al., 2012; MAK; HUNDHAUSEN; NESTLE, 2009; RAHMAN et al., 2015).



Fonte: Adaptado de Rahman et al., 2015.

Atualmente estão identificados dez segmentos, *loci* ou genes, associados com a susceptibilidade à psoríase. Dentre essas regiões, denominadas *PSORS* (*psoriasis susceptibility*), está a região *PSORS1*, localizada no cromossomo 6p21, considerada o maior determinante genético da psoríase (MAHIL; CAPON; BARKER, 2015). Essa região

corresponde ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP), onde estão os genes que codificam os Antígenos Leucocitários Humanos (ALH) (FELETAR et al., 2008; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; PUIG; JULIÁ; MARSAL, 2014). Estudos com gêmeos mostraram que as taxas de concordância são muito mais altas em gêmeos monozigóticos do que em gêmeos dizigóticos. Fatores genéticos explicam 68% da variação na suscetibilidade à psoríase. O *PSORS1* inclui o alelo ALH-Cw6, que tem o maior efeito genético em caucasianos. Estudos de associação genômica ampla da psoríase identificaram 36 locos gênicos associados à psoríase. Esses genes estão envolvidos na função de barreira cutânea (LCE3A, LCE3C e LCE3D), sinalização de células T (IL2, IL21, IL12B, IL13, IL23A, IL23R, RNF114 (anteriormente ZNF313), NFKB, NFKBIA, TYK2, TNFAIP3, TNIP1 e TRAF3IP2) e apresentação antigênica (ERAP1 e HLA-C) (LONNBERG; ZACHARIAE; SKOV, 2014; MAHIL; CAPON; BARKER, 2015).

A psoríase trata-se de uma doença etiológica multifatorial, na qual fatores genéticos e influências ambientais levam a uma disfunção imunocelular, responsável pelo quadro inflamatório característico, no qual citocinas e quimiocinas possuem um papel importante no recrutamento de linfócitos e na manutenção do processo inflamatório (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005; SARRA et al., 2011).

A complexa imunopatogênese da psoríase envolve alterações tanto do sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais), quando do sistema imunológico adquirido (linfócitos T), mediado por citocinas, e inclui várias etapas pelas quais a pele pré-psoriática é convertida em uma placa psoriática após a ativação imunocítica (CONRAD; GILLIET, 2018).

A formação das lesões é característica da psoríase e incluem uma resposta do tecido angiogênico; recrutamento e acúmulo de células inflamatórias na derme, envolvendo grande população de células apresentadoras de antígeno e células T; e a liberação de citocinas pro-inflamatórias que contribuem para um ciclo vicioso de inflamação no interior das lesões cutâneas (GREB et al., 2016). Esses eventos culminam na remodelação da EP, com proliferação e diferenciação alterada de queratinócitos (CONRAD; GILLIET, 2018; GREB et al., 2016; NICKOLOFF, 2007).

O evento inicial da psoríase envolve um gatilho, resultante de uma ação entre fatores genéticos e o estilo de vida, como trauma, uso de medicamentos, infecção, álcool, tabagismo e estresse, que desencadeiam uma cascata inflamatória e imunológica (SALA; ELAISSARI; FESSI, 2016). Queratinócitos liberam fatores que ativam as células dendríticas dérmicas, que por sua vez ativam as células T nos nódulos linfáticos. As células T, em seguida, diferenciam-

se em células T *helper* tipo 1 (Th1, produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2) e T *helper* tipo 17 (Th17, produtoras de IL-17, TNF- α , IL-6; IL-22) e migram de volta para a DE e EP, através de quimiocinas e moléculas de adesão (SALA; ELAISSARI; FESSI, 2016). Em seguida, as células T ativadas ativam os macrófagos a liberarem diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-12 e IL-23 que facilitam a proliferação de linfócitos Th1/Th17 e também levam a ativação e hiperproliferação de queratinócitos, manifestando-se clinicamente como placas psoriáticas (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; NICKOLOFF, 2007).

Tanto no início quanto na exacerbação do quadro inflamatório da psoríase, as células dendríticas ativadas produzem entre outros mediadores o TNF- α , citocina pró-inflamatória capaz de ampliar a inflamação através de várias vias de sinalização (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018). O TNF- α pode ser produzido por uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, queratinócitos e células endoteliais, e exerce sua atividade induzindo a produção de mediadores secundários e moléculas de adesão que facilitam a interação e migração de células T em direção a EP (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; SCHÖN; BOEHNCKE, 2005).

2.3 TRATAMENTO DA PSORÍASE

O tratamento da psoríase ainda é baseado no controle dos sintomas. Terapias tópicas e sistêmicas, bem como fototerapia, estão disponíveis. Na prática, uma combinação desses métodos é frequentemente usada. Até agora não há terapia que daria esperança para uma cura completa da psoríase. Além disso, o atendimento de pacientes com psoríase requer não apenas tratar lesões de pele e envolvimento articular, mas também é muito importante identificar e tratar comorbidades comuns que já existem ou pode desenvolver, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas, bem como condições psicológicas (WHO, 2016).

A escolha terapêutica para o tratamento da psoríase é realizada com base na gravidade da doença. Aproximadamente 70-80% dos pacientes utilizam a terapia tópica como os análogos da vitamina D3 e retinoicos em associação aos corticosteroides. Nos casos de psoríase moderada a severa, recomenda-se a terapia sistêmica com agentes imunossupressores e quimioterápicos (ciclosporina, metotrexato e retinoides), associada à terapia tópica e fototerapia (BERTH-JONES, 2013; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; SCHÖN; BOEHNCKE, 2005). Embora a maioria dos regimes terapêuticos estabelecidos seja razoavelmente eficaz como terapia de

curto prazo para psoríase, devido ao perfil de segurança desses fármacos, seu uso por um longo prazo é limitado, o que dificulta o controle da doença (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005).

Os recentes avanços nos estudos da psoríase forneceram subsídios para a concepção de novos agentes biológicos modificadores da resposta imunoinflamatória através da sua ação nos mecanismos-chave da patogênese da psoríase. Dentre os biológicos e outros novos agentes aprovados para o tratamento da psoríase nos Estados Unidos, destacam-se os anticorpos monoclonais antagonistas de TNF- α (adalimumabe, infliximabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe) e moduladores da diferenciação de linfócitos mediado por IL-17 (ixekizumabe, secukinumabe, brodalumabe), IL-12, IL23 p40 (ustecinumabe), IL23 p19 (guselkumabe e tildrakizumabe), PDE4 (apremilaste) e JAK (tofacitinibe) (CONRAD; GILLIET, 2018). Porém, apresentam desvantagens que incluem a via de administração, propriedades imunossupressoras e elevado custo, sendo atualmente utilizados somente em casos graves e quando os demais tratamentos não são adequados (CHI; WANG, 2014; RAHMAN et al., 2015).

Quanto ao tratamento tópico, principalmente para psoríase leve ou moderada, inclui pomadas (por exemplo, calcipotriol, inibidores de calcineurina, tretinoína, glicocorticoide), banho medicamentoso com diástase ou extratos de ervas e fototerapia. A fototerapia é um tratamento eficaz, seguro e acessível, sem incorrer em efeitos colaterais sistêmicos, em contraste com agentes biológicos ou outros medicamentos, especialmente para a psoríase em placas estável. Além disso, a fototerapia pode ser combinada com agentes biológicos para o tratamento da psoríase grave (ZHANG; WU, 2018).

A radiação ultravioleta atua através de vários mecanismos e alterações no ciclo celular, alterações nas citocinas e supressão das células T, resultando em seu efeito terapêutico. A terapia que utiliza a radiação ultravioleta B de banda larga e substâncias/compostos fotoativos é a mais utilizada por ser mais eficaz contra a psoríase (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019; ZHANG; WU, 2018). A aplicação de alcatrão de carvão e a radiação UV-B subsequente foi o primeiro regime de fototerapia, conhecido como “regime de Goeckermann”, mas foi abandonado devido ao potencial carcinogênico das preparações de alcatrão de carvão, bem como às limitações de tempo da terapia (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019; CHOI; ADELZADEH; WU, 2015).

Extratos de plantas contendo psoralenos (furocumarinas) também foram utilizados para o tratamento de doenças da pele juntamente com a fototerapia. A administração oral de 8-metoxipsoraleno obtida do gênero *Heracleum* (Apiaceae), seguida pela irradiação da luz ultravioleta (faixa de 320 a 400 nm), mostrou-se eficaz no tratamento da psoríase, iniciando um novo campo de fototerapia. Nesse caso, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos atuam como

sensibilizadores, realizando um efeito fotodinâmico (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019).

Diversos tipos de fototerapia foram desenvolvidos e podem ser empregados para o tratamento da psoríase, entre eles, a luz ultravioleta B de banda larga (BL-UVB, 290-320 nm) foi desenvolvida pela primeira vez, mas mais tarde foi substituída pelo ultravioleta de banda estreita B (BE-UVB, 311 nm), pois o último é mais eficaz que o primeiro. O laser de excímero/ de 308 nm usado como fonte monocromática de UVB para tratamento de psoríase. A vantagem de usar o laser de excímero é sua capacidade de direcionamento, que pode poupar a pele não afetada e, ao mesmo tempo, fornecer altas doses à pele psoriática (ZHANG; WU, 2018).

Uma fotoquimioterapia convencional usando UV é chamada psoraleno ultravioleta A (PUVA), que combina um fármaco fotossensibilizador e radiação ultravioleta. O PUVA pode ser PUVA sistêmico (oral, injeção) ou banho/creme - ambos utilizados no tratamento da psoríase em placas na fase estacionária (ZHANG; WU, 2018). Fotoquimioterapia combinando agentes fotossensibilizadores e a irradiação subsequente pode ser usada em muitos campos clínicos. A fototerapia baseia-se na modificação da expressão de citocinas, apoptose de linfócitos e imunossupressão cutânea.

No entanto, a fototerapia tem sido relacionada a alto risco de câncer de pele não melanoma e outras doenças malignas. Como dermatose inflamatória, a psoríase é uma doença benigna com risco aumentado de melanoma maligno, para o qual o tratamento com UV-A não é indicado. Uma maneira possível de reduzir esse risco carcinogênico é pela aplicação tópica dos fotossensibilizadores em vez da administração sistêmica (ZHANG; WU, 2018).

Nesse sentido, a terapia fotodinâmica pode ser uma boa opção para a terapia de psoríase, principalmente devido à ausência de efeito carcinogênico. A aplicação tópica da terapia fotodinâmica tem sido amplamente utilizada em tumores cutâneos, e esse tipo de administração evita a fotossensibilização duradoura e também efeitos imunossupressores sistêmicos. Além disso, a terapia fotodinâmica é capaz de induzir muitos efeitos, como modificar as características funcional do sistema imunológico da pele, sendo um tratamento relevante para a psoríase (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019).

A terapia fotodinâmica é uma técnica que envolve a liberação de um agente fotossensível a áreas específicas da pele, levando à morte celular seletiva após irradiação com luz visível (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019). A terapia fotodinâmica é um tratamento de luz que envolve a aplicação sistêmica ou local de um composto fotossensibilizante, que se deposita preferencialmente nas células-alvo, e é seguida pela iluminação seletiva da lesão com luz visível (CHOI; ADELZADEH; WU, 2015). Além disso, a terapia fotodinâmica pode

melhorar a remodelação dérmica (produção de fibras colágenas tipo I e II) e resolver a inflamação crônica (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019).

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que utiliza um produto químico não tóxico (fotossensibilizador) para criar preferencialmente dano oxidativo no tecido quando exposto à luz. Existem quatro componentes principais na terapia fotodinâmica: fotossensibilizador, fonte de luz, oxigênio e o alvo celular; cada um desses fatores pode ser manipulado para melhorar a seletividade do tratamento. A combinação desses quatro componentes, que são elementos não tóxicos individualmente, é responsável pela morte de células patológicas mediada pela terapia fotodinâmica (MAYTIN et al., 2012; TANDON; YANG; BARON, 2008;).

Durante a terapia fotodinâmica, na presença de oxigênio, o composto não tóxico ativado pode reagir com moléculas vizinhas, gerando espécies reativas do oxigênio que podem induzir as células a se tornarem inviáveis ou promover a destruição seletiva das células alvo. No entanto, para obter respostas clínicas satisfatórias na psoríase, apenas a indução de alterações funcionais nos tipos de células alvo já pode ser boa (CHOI; ADELZADEH; WU, 2015).

Portanto, a limitação mais comum descrita na terapia fotodinâmica em todos os estudos, é a sensação de queimação, que reduz a adesão do paciente ao tratamento. No entanto, os efeitos adversos dependem da concentração dos fotossensibilizadores e da energia aplicada. Além disso, pode ocorrer fotossensibilidade cutânea nos pacientes, que devem evitar se expor à luz intensa até 24 horas após a aplicação, devido à possibilidade de formação de bolhas e hiperpigmentação. A maioria dos casos de psoríase é leve e pode ser tratada com a terapia tópica. A terapia de segunda linha da psoríase utiliza fototerapia ou terapia sistêmica (BRUSCHI; DA SILVA; ROSSETO, 2019).

Os tratamentos farmacológicos atuais para a psoríase são frequentemente associados à eficácia limitada e problemas relacionados à toxicidade, imunossupressão, dentre outros. Novas estratégias empregadas no tratamento da psoríase buscam melhorar a relação risco-benefício dos corticoides e dos fármacos tradicionalmente utilizados (AGRAWAL; PETKAR; SAWANT, 2010). Esforços estão sendo feitos no desenvolvimento de nanopartículas para aplicações dermatológicas, como propósito de proporcionar uma liberação sustentada dos fármacos por um tempo maior, reduzir a toxicidade e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (AGRAWAL; PETKAR; SAWANT, 2010; PINTO et al., 2014; PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013).

Dentre as propostas terapêuticas para a psoríase, produtos biológicos como os inibidores de calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus) têm demonstrado melhoras no fenótipo da doença (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

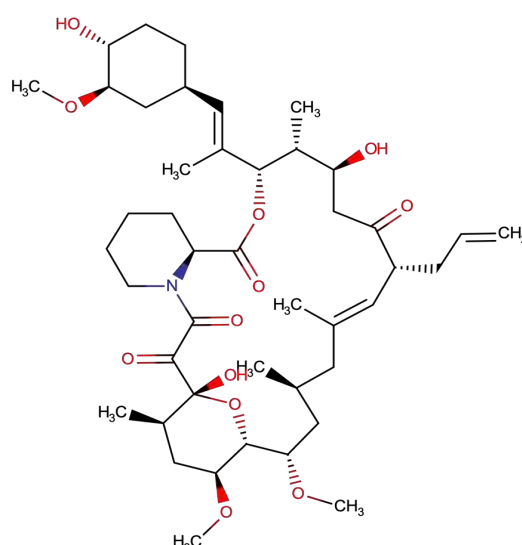
2.3.1 Tacrolimus

Tacrolimus (Tac) ou FK506 ou Fujimicina (figura 9) foi extraído pela primeira vez do caldo de fermentação de *Streptomyces tsukubaensis*, um micróbio do solo encontrado em Tsukuba, Japão. O nome tacrolimus é derivado a partir do *t* para Tsukuba, o nome da montanha onde a amostra foi extraída, *acrol* para macrolídeo e *imus* para imunossupressores (GUPTA; ADAMIAK; CHOW, 2002).

Tacrolimus tem efeito inibitório seletivo sobre os linfócitos T e é um imunossupressor amplamente utilizado no transplante de órgãos. Este fármaco foi descrito pela primeira vez por Tanaka e grupo em 1990, e depois grande número de derivados e análogos foram descobertos por outros grupos de pesquisadores (DHEER et al., 2018).

Tacrolimus é um antibiótico lactônico da classe dos macrolídeos, hidrofóbico, com peso molecular de 822,05 e praticamente insolúvel em água ($4\text{--}12\mu\text{g mL}^{-1}$), apresentando elevada lipofilicidade ($\log P= 6,09$) (YAMANAKA et al., 2014). Tacrolimus possui baixa solubilidade em água e boa permeabilidade em todo o trato gastrointestinal; tem um baixo índice terapêutico e foi classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC) como classe II (MERCURI et al., 2016; YU et al., 2018).

Figura 9 - Estrutura molecular do tacrolimus.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00864>.

Tem sido relatado também para este fármaco uma baixa biodisponibilidade oral, pois é extensamente metabolizado pelas isoenzimas gastrointestinal e hepática do citocromo P450 (CYP) 3A (principalmente CYP3A5, com CYP3A4 tendo uma eficiência catalítica mais baixa) e é um substrato para o transportador de efluxo da glicoproteína-P / multirresistência à fármacos 1 (PgP/MDR1) (MERCURI et al., 2016; YU et al., 2018).

Inicialmente o Tac foi usado para a imunossupressão sistêmica de pacientes que haviam sido submetidos a transplantes de aloenxerto impedindo-os de rejeitar seus novos enxertos (BENSON et al., 2008; SCHÜTTE-NÜTGEN et al., 2018). Porém, devido a casualidade da ciência, notou-se que o Tac poderia produzir resultados favoráveis em doenças de pele em alguns dos pacientes transplantados (LANDY et al., 2013).

Desde 1990 houve uma quantidade significativa de pesquisas conduzidas não apenas com relação às indicações licenciadas para o uso do Tac, mas também em indicações fora de licença, como no caso da psoríase (MALECIC; YOUNG, 2016). Tac para uso tópico foi introduzido pela primeira vez no Japão no ano de 1999, seguido pelos Estados Unidos em 2000 e pela Europa em 2001, para o tratamento da dermatite atópica moderada a grave (SEHGAL; SRIVASTAVA; DOGRA, 2008a). O FDA recomenda que o Tac seja usado apenas como agente de segunda linha para a dermatite atópica, porém é perfeitamente aceitável, no entanto, que médicos prescrevam um determinado medicamento para tratar outra condição, isso é chamado de “uso off-label”, podendo ser extremamente útil para algumas pessoas que têm psoríase (MALECIC; YOUNG, 2016). Em 10 de março de 2005, o FDA emitiu um alerta para os profissionais de saúde, aconselhando-os a usar o tacrolimus e o pimecrolimus apenas conforme indicado e somente após a falha de outros tratamentos, devido a um possível risco de câncer (SEHGAL; SRIVASTAVA; DOGRA, 2008a)

Tac é eficaz em terapia de emergência ou imunossupressão primária e para as condições imunoinflamatórias tópicas, incluindo dermatite atópica e psoríase (DHEER et al., 2018). Disponíveis comercialmente, pomada de Tac e creme de pimecrolimus, são aprovados para o tratamento da dermatite atópica em adultos e crianças com 2 anos ou mais, que não respondem ou são intolerantes à terapia com corticosteroides tópicos de primeira linha (GUENTHER; LYNDE; POULIN, 2019; LIN, 2010; SEHGAL; SRIVASTAVA; DOGRA, 2008b).

Tac apresenta uma classe importante na terapia tópica para uma ampla gama de distúrbios da pele cuja patogênese envolve inflamação e/ou desregulação das respostas imunocelulares (LIN, 2010). No entanto, durante a década passada, seu uso foi estendido a vários distúrbios dermatológicos inflamatórios com um grau variável de sucesso, como o uso no líquen plano oral, vitiligo, dermatite seborreica, rosácea, dermatite de contato, lúpus

eritematoso cutâneo, dermatite peitoral, líquen escleroso, morfeia/esclerodermia localizada, síndrome de Netherton, alopecia aerata, pioderma gangrenoso, ictiose linear circunflexa (GUENTHER; LYNDE; POULIN, 2019; LIN, 2010; SEHGAL; SRIVASTAVA; DOGRA, 2008ab).

O Tac tem sido descrito para uso também em colite ulcerativa, oftalmologia, artrite reumatoide (sobretudo quando utilizado com metotrexato), dermatite atópica severa e uveíte refratária grave após transplante de medula óssea (BIDDLE, K.; AHMED, S. H., 2019; HOSSAIN et al., 2015; MALECIC; YOUNG, 2016; SCHÜTTE-NÜTGEN, K. et al.; 2018).

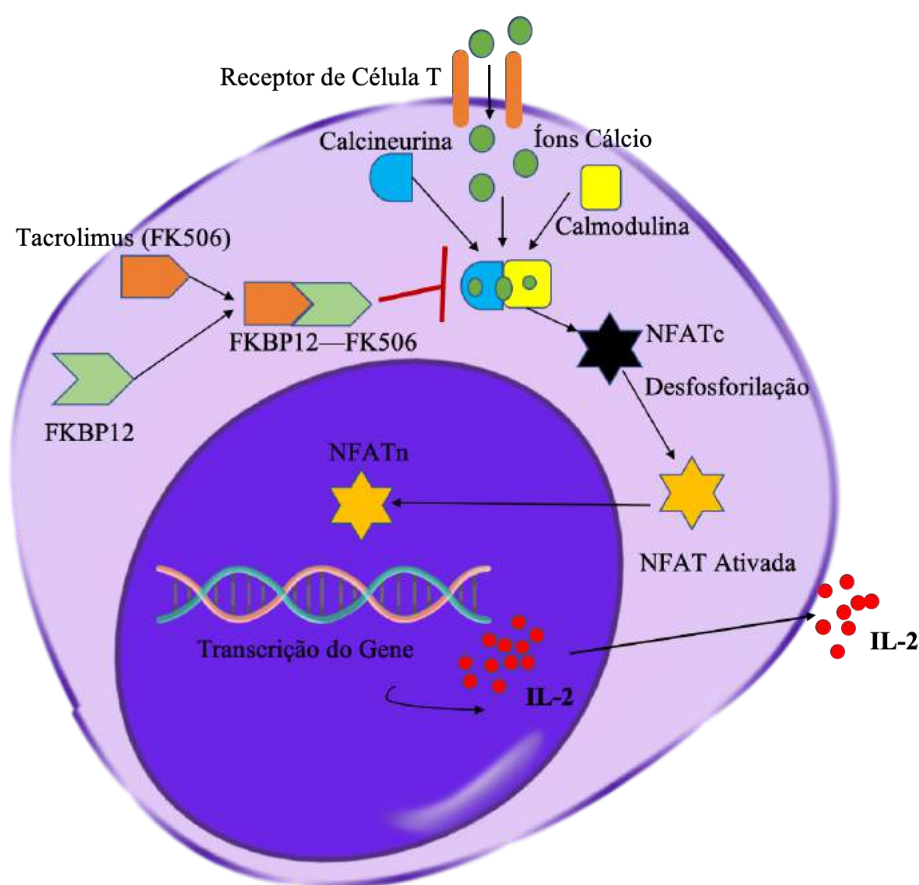
Tac inibe a ativação das células T, no início de transcrição do gene, bloqueando a transcrição do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), os quais resultam da inibição da fosfatase (calcineurina), consequentemente modulando a produção de citocinas e a ativação celular (DHEER et al., 2018; POPLÉ; SINGH, 2010).

A calcineurina é uma serina-treonina fosfatase Ca^{2+} dependente, também conhecida como proteína fosfatase 2B. É responsável por ativar a transcrição da IL-2, que estimula o crescimento e a diferenciação da resposta das células T (BIDDLE; AHMED, 2019; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2013). Um substrato da calcineurina, um componente citoplasmático do NFAT (NFATc), passa do citoplasma para o núcleo depois da desfosforilação. Ao associar-se a outros componentes nucleares da NFAT (NFATn), este substrato da calcineurina regula a transcrição de muitos genes, incluindo aqueles que codificam a IL-2, o fator estimulador de colônias de granulócitos, macrófagos (GM-CSF), $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\alpha$ e outras interleucinas (SALA; ELAISSARI; FESSI, 2016).

Tac reduz a atividade da peptidil-prolil-isomerase ligando-se à imunofilina FKBP-12 (proteína de ligação do FK506) criando um novo complexo. Este complexo FKBP12-FK506 interage e inibe a calcineurina impedindo a desfosforilação do fator nuclear (NFATn) e do fator de transcrição das células T ativadas e, portanto, há uma atividade reprimida dos genes que codificam a IL-2 no núcleo, evitando assim a transdução do sinal dos linfócitos T e a transcrição da IL-2 (figura 10) (VICARI-CHRISTENSEN et al., 2009).

Tac também causa diminuição da transcrição e liberação de outras citocinas derivadas de células T, incluindo IL-3, IL-4, IL-8, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos; também foi descoberto que a exocitose de células T citotóxicas é inibida pelo fármaco. Pesquisas *in vitro* revelaram que os níveis de p53 (gene regulador do ciclo celular) na pele psoriática também estão diminuídos e que há um aumento da expressão do gene p53 pelo tratamento com Tac, resultando em uma taxa reduzida de hiperproliferação epidérmica (MALECIC; YOUNG, 2016).

Figura 10 - Mecanismo de ação do tacrolimus.



Fonte: Próprio autor.

Embora tenha mostrado eficácia notável, os efeitos colaterais mais comumente observados com o seu uso tópico são sensação de queimação e coceira no local da aplicação. Também foi relatado que tem potencial para aumentar o risco de infecções cutâneas alterando as respostas imunes cutâneas locais e pode aumentar a gravidade de infecções virais por herpes zoster ou poliomavírus. Há relatos mostrando as incidências no aparecimento de doença linfoproliferativa após exposição prolongada ao tacrolimus. Além de apresentar risco de malignidade, também possui um índice terapêutico restrito e potencial para sérias interações medicamentosas (POPLE; SINGH, 2011).

O veículo convencional disponível no mercado farmacêutico para aplicação tópica do Tac, embora seja eficaz, é uma forma farmacêutica semissólida, contendo em sua composição as vaselinas sólida e líquida, cera branca e parafina sólida, de elevada viscosidade, lipofílica e que quando aplicada sobre a pele apresenta um sensorial desagradável (POPLE et al., 2010).

O veículo da apresentação farmacêutica do tacrolimus não assegura a liberação tópica adequada do fármaco, o que tem demonstrado baixa penetração e flutuações nas concentrações nas camadas da pele (POPLE et al., 2010).

Além do mais, os compostos com massa molecular superior a 500 g/mol têm dificuldade em penetrar na pele, o que dificulta a disponibilidade do fármaco no seu sítio de ação (BOS; MEINARDI, 2000).

Avanços recentes em vários sistemas de administração de fármacos foram investigados para o Tac. A questão da baixa solubilidade aquosa tem sido bem estudada por meio de várias técnicas, incluindo dispersões sólidas, complexos de inclusão, sistemas de liberação de medicamentos auto-microemulsionáveis supersaturáveis, bem como muitos outros (DHEER et al., 2018).

Por conseguinte, é um desafio superar a baixa taxa de penetração do Tac através da pele e, ao mesmo tempo, conseguir a liberação específica no local para melhora da eficácia terapêutica com o mínimo de efeitos tóxicos. Dessa forma, estudos estão sendo conduzidos no desenvolvimento de novas estratégias, buscando melhorar a relação risco-benefício dos corticoides e dos fármacos tradicionalmente empregados no tratamento da psoríase.

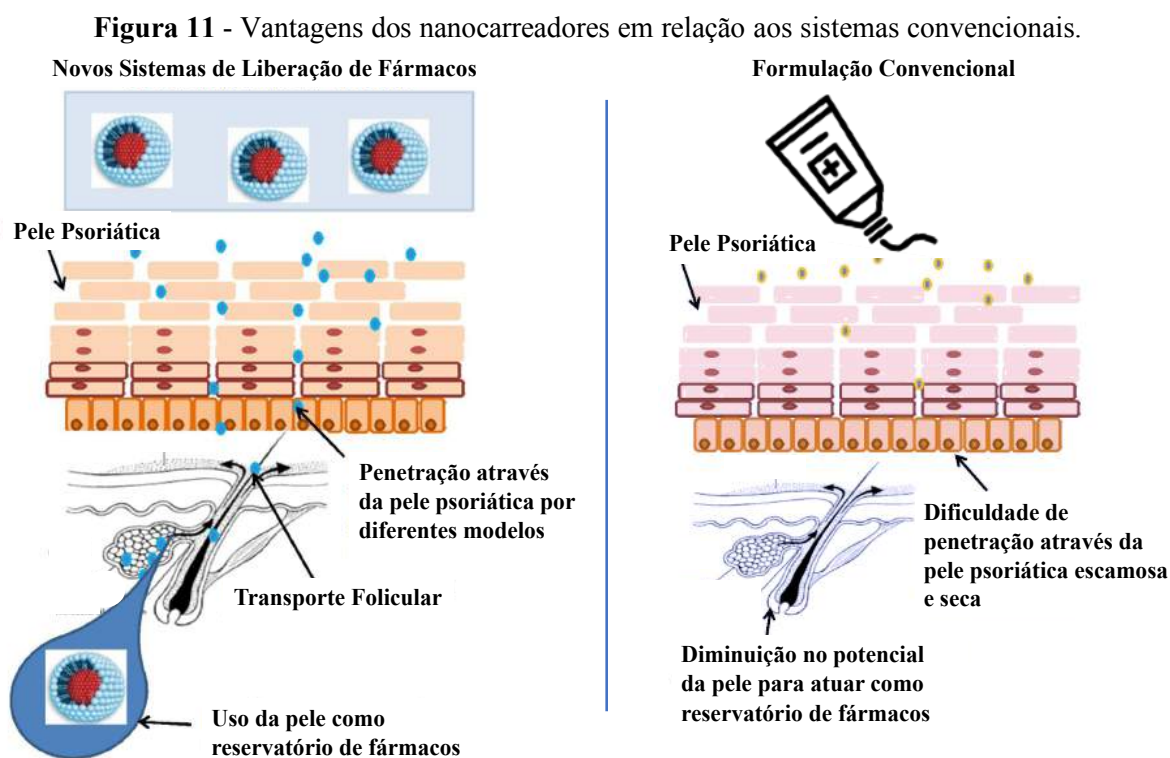
Portanto, esforços estão sendo feitos no desenvolvimento de nanopartículas para aplicações dermatológicas, com o propósito de proporcionar uma liberação sustentada dos fármacos por um tempo maior, reduzir a toxicidade e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (AGRAWAL; PETKAR; SAWANT, 2010; PINTO et al., 2014; PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013).

2.4 SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Os nanocarreadores são sistemas de liberação de fármacos com tamanho na faixa nanométrica. Esses sistemas fornecem um direcionamento mais efetivo de fármacos para seus locais de ação, resultando na melhoria da eficácia terapêutica. Eles podem induzir uma redução na dose de princípios ativos e, consequentemente, os efeitos colaterais (GUPTA; AGRAWAL; VYAS, 2012).

Muitos estudos têm sido empregados no desenvolvimento de tecnologias para sistemas de liberação modificada na pele e são realizados com o objetivo de promover a liberação de fármacos através do EC. Entre eles, destacam-se o desenvolvimento de lipossomas, nanopartículas poliméricas, metálicas e NLS, CLN, micelas, nanoemulsões, dendrímeros (CEVC; VIERL, 2010).

Esses sistemas foram criados para superar as restrições físico-químicas de ativos, tais como a baixa solubilidade, baixa penetração, alto peso molecular, meia-vida curta, reações adversas e toxicidade, os quais são usados para aumentar a permeação ou a penetração de fármaco pelas camadas da pele, solubilizar fármacos lipofílicos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos (SCHWARZ et al., 2012). As vantagens dos novos transportadores de fármacos sobre um sistema convencional de uso tópico são mostradas na figura 11.



Fonte: Adaptado de Dadwa; Mishra; Narang, 2019.

Para a utilização eficaz dessas possibilidades, a passagem de fármaco depende totalmente de sua capacidade em atravessar algumas barreiras, controlando a liberação e a estabilidade da substância ativa no estado nanométrico (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018).

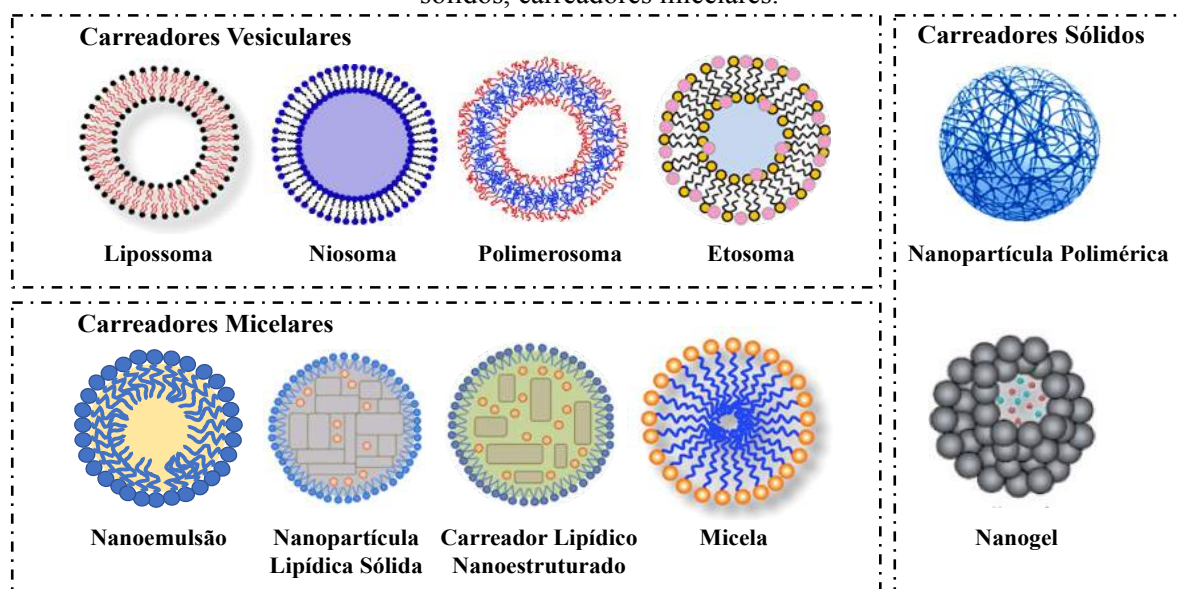
Esses sistemas de base nanotecnológica para aplicação tópica envolvendo a psoríase vem crescendo devido às suas características únicas de interação com a pele e por modificar a sua propriedade de barreira (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017; RAHMAN et al., 2015; SANTOS et al., 2013).

De acordo com Murphy et al., (2019), os sistemas coloidais são classificados genericamente em três classes amplas: carreadores vesiculares, que geralmente encapsulam

ativos em um núcleo aquoso, incluindo nesta classe os lipossomas, niosomas, polimerosomas; carreadores micelares, que tipicamente encapsulam fármacos em um núcleo hidrofóbico, como as nanoemulsões, NLS, CLN e os emulsomas; e os carreadores em fase sólida, que encapsulam fármacos em uma matriz sólida ou possuem fármacos diretamente conjugadas a elas, incluindo neste grupo as nanopartículas de ouro, as nanopartículas poliméricas e os nanogéis.

A seleção dos nanocarreadores depende do local de ação, tipo de fármaco a ser encapsulado, barreiras fisiológicas durante a administração do medicamento, estabilidade e solubilidade dos nanocarreadores. As estruturas das diferentes formas de nanocarreadores, baseados na definição de Murphy, Schaffter e Friedman (2019), são apresentadas na figura 12.

Figura 12 - Estrutura dos nanocarreadores organizados em carreadores vesiculares, carreadores sólidos, carreadores micelares.



Fonte: Adaptado de Murphy; Schaffter; Friedman, 2019.

Pradhan, Singh e Singh (2013) classificam os novos sistemas coloidais de liberação de fármacos com base no principal componente da formulação em veículos coloidais à base de lipídeos, subclassificados em carreadores vesiculares, como os transferosomas, niosomas, lipossomas e etosomas; carreadores particulados, incluídos neste grupo as NLS e os CLN; e os carreadores baseados em emulsão, como as microemulsões e nanoemulsões. A segunda classe de sistemas de liberação são os veículos coloidais poliméricos automontados, como as micelas poliméricas, os dendrímeros e os nanogéis. Na terceira classe estão os carreadores particulados poliméricos, estando dentro desta categoria as nanoesferas poliméricas. Uma quarta categoria de classificação são os carreadores capsulares, incluindo as nanocápsulas.

Para Chamundeeswari, Jeslin e Verma (2018), os nanocarreadores com alta relação superfície-volume, formam principalmente três tipos: nanocarreadores orgânicos, que incluem nanopartículas como as NLS, lipossomas, dendrímeros, nanocarreadores poliméricos, micelas e nanocarreadores virais; nanocarreadores inorgânicos, incluem as nanopartículas de ouro, nanocarreadores magnéticos, nanotubos de carbono, quantum dots e mesoporos de sílica; e nanocarreadores híbridos, que combinam dois ou mais nanocarreadores orgânicos e inorgânicos juntos ou individualmente. Inclui multicomponentes orgânicos-inorgânicos e inorgânicos-inorgânicos. Alguns dos exemplos para nanocarreadores híbridos são um híbrido lipídeo-polímero e híbrido de polímero-cerâmico, que incorporando duas nanopartículas juntas possuirá a natureza dupla de ambas as nanopartículas, melhorando suas propriedades.

2.4.1 Nanosistemas inovadores

O objetivo máximo de selecionar nanocarreadores adequados para a administração de fármacos é aumentar a disponibilidade do agente terapêutico com efeitos colaterais mínimos ou nulos (CHAMUNDEESWARI; JESLIN; VERMA, 2018). A seguir serão apresentados os principais nanosistemas e alguns mais recentemente desenvolvidos com finalidade para aplicação tópica.

2.4.1.1 Lipossomas

Os lipossomas são estruturas vesiculares fosfolipídicas em duas camadas que encerram um volume aquoso. A bicamada pode diferenciá-la em vesícula unilamelar (uma bicamada) ou vesícula multilamelar (mais de uma bicamada) (CHAMUNDEESWARI; JESLIN; VERMA, 2018).

Os lipossomas são adequados para transportar fármacos hidrofílicos (no núcleo aquoso) e lipofílicos (na bicamada lipídica) devido à sua natureza anfifílica. Esse recurso diferenciado de liberação dupla permite a liberação simultânea de fármacos de solubilidades opostas na aplicação à pele, com efeito terapêutico aprimorado e desejado (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017).

A administração dérmica de fármacos através dos lipossomas é favorecida por seu pequeno tamanho, propriedades lamelares, elásticas e fluidas. A liberação do fármaco dos lipossomas é regulada pela composição da bicamada lipídica, organização da membrana e lipofilicidade do fármaco. Os lipossomas ganharam inúmeras aplicações na administração de

medicamentos antipsoriáticos (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013; SHIRSATH; GOSWAMI, 2019).

2.4.1.2 Transférosomas

Transférosomas são lipossomas com propriedades especiais (elásticos ou ultra flexíveis), capazes de atravessar o EC e penetrar profundamente na pele. Numerosos estudos mostraram a superioridade desse sistema em relação aos lipossomos e até mesmo aos etosomos (SALA et al., 2018).

Os transférosomas são compostos por várias bicamadas de fosfolípidos com um componente adicional, isto é, o ativador de membrana. Sua peculiaridade se deve às interessantes propriedades elásticas obtidas quando o ativador de membrana é adicionado. Os ativadores de membrana mais usados são colato de sódio, desoxicolato, span® 60, span® 65, span® 80, tween® 20, tween® 60, tween® 80 e glicirrizinato dipotássio (LEI et al., 2013).

Os transférosomas penetram facilmente pela região intercelular do estrato córneo transpassando os lípidos lamelares. Isso se deve à alta deformabilidade da vesícula, que permite a entrada devido ao estresse mecânico do entorno, de maneira auto adaptável (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013).

Os transférosomas atravessam a pele por processo de difusão sem romper a vesícula devido às suas membranas altamente flexíveis. Foi relatado que este sistema é altamente recomendado para doenças de pele como psoríase do que formulações convencionais devido à sua especificidade e segurança (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013; SALA et al., 2018).

2.4.1.3 Proglicosomas

Proglicosomas são lipossomas deformáveis obtidos pela adição do propilenoglicol como ativador de borda. Eles foram desenvolvidos a partir de uma abordagem na modulação de composições de vesículas de fosfolípidos, resultando no delineamento de novos transportadores vesiculares deformáveis (elásticos). Estudos sugerem que a presença de ativadores de borda, como surfactantes e etanol, desestabiliza as bicamadas lipídicas e aumenta a deformabilidade das vesículas. Com base nessas considerações, os proglicosomas foram desenvolvidos para modificar os lipossomas incluindo o propilenoglicol como ativador de borda, inicialmente para uso ocular. Neste caso, o propilenoglicol foi selecionado devido à sua

boa tolerabilidade ocular, presença de grupo hidroxila e efeito plastificante conhecido (GARG et al., 2017).

2.4.1.4 Etosomas

Etosomas são vesículas lipídicas compostas por fosfolipídeos (fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina) e uma grande quantidade de água e etanol (20-45%) (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017; SALA et al., 2018). A característica do etosoma é devido à sua alta concentração de etanol, responsável por perturbar a organização da bicamada lipídica da pele. Assim, essas vesículas à base de etanol penetram facilmente no estrato córneo e são relatadas como seguras para uso farmacêutico e cosmético (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013).

Os etosomas são adequados para sistema de liberação de fármaco de uso tópico, pois permanecem confinados à camada superior do estrato córneo. Devido à alta concentração de etanol, ele aumenta a capacidade da vesícula de se infiltrar no estrato córneo, causando uma influência perturbadora na bicamada lipídica da pele. Eles também foram utilizados para a liberação dérmica e transdérmica de diversos fármacos para o tratamento de várias doenças de pele, como alopecia, dermatite e psoríase (SALA et al., 2018).

2.4.1.5 Niosomas

Niosomas são vesículas preparadas por surfactantes ou vesículas de surfactantes não-iônicos. Os niosomas são semelhantes, em termos de estrutura e propriedades físicas, aos lipossomas. Eles também são preparados, como vesículas unilamelares ou multilamelares, seguindo os mesmos procedimentos e sob a mesma variedade de condições (MARIANECCI et al., 2014).

Existem dois principais componentes utilizados para a preparação de niosomas: compostos lipídicos (colesterol ou fosfatidilcolina) e surfactantes não iônicos. Os compostos lipídicos são utilizados para fornecer natureza inflexível, forma apropriada e adaptação para os niosomas. Os surfactantes assumem a parte principal no desenvolvimento dos niosomas. Os surfactantes não iônicos que acompanham a maior parte para o arranjo de niosomas são os spans® (60, 40, 20, 85 e 80), tweens® (20, 40, 60 e 80) e brij® (30, 35, 52, 58, 72 e 76). Os niosomas são classificados de acordo com três fatores: a função básica do tamanho dos niosomas; o método de preparação; com base no tamanho da vesícula. Portanto, os niosomas podem ser separados em três grupos, incluindo pequenas vesículas unilamelares (SUVs,

tamanho = 0,025-0,05 μm), vesículas multilamelares (MLVs, tamanho $\geq 0,05 \mu\text{m}$) e grandes vesículas unilamelares (LUVs, tamanho $\geq 0,10 \mu\text{m}$) (GHARBAVI et al., 2018).

Os niosomas são capazes de superar algumas desvantagens associadas aos lipossomas, pois os surfactantes são facilmente derivatizados e conferem uma maior versatilidade à estrutura vesicular e, além disso, têm custos mais baixos que os fosfolipídeos. Ao contrário das vesículas fosfolipídicas, os niosomas são altamente resistentes à oxidação (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018).

Os niosomas são sistemas vesiculares preparados pela hidratação de surfactantes não iônicos sintéticos, com ou sem colesterol ou outros lipídeos (MARIANECCO et al., 2014). Sua natureza é anfifílica, podendo encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Os niosomas são caracterizados por tamanho, forma e química de superfície que são capazes de aprimorar a farmacocinética intrínseca dos fármacos e fornecer melhor direcionamento aos locais de ação. As formulações niosômicas reduzem a absorção sistêmica, aumentando o tempo de permanência dos princípios ativos no estrato córneo e na camada epidérmica. Além disso, eles diminuem a perda de água transepidermal, aumentando a hidratação e aprimorando as propriedades da camada córnea (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017).

Os niosomas foram utilizados com sucesso no tratamento da psoríase com efeitos colaterais reduzidos e melhor adesão de pacientes (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013; SHIRSATH; GOSWAMI, 2019).

2.4.1.6 Novasomas

Novasomas são as formas modificadas de lipossomas ou uma variedade de niosomas organizados a partir da mistura de monoéster de ácidos graxos de polioxietileno, colesterol e ácido graxos livres na proporção 74:22:4 e têm 0,1 a 1,0 μm de diâmetro. Eles podem ser definidos como as vesículas paucilamelares não fosfolipídicas de 0,1-1,0 micrômetro de diâmetro (SINGH; MALVIYA; SHARMA, 2011).

Novasomas consistem em membranas de duas a sete camadas que circundam um espaço não estruturado ocupado por um grande núcleo amorfo de materiais hidrofílicos ou hidrofóbicos (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018).

Pode-se dizer que novasomas são estruturas melhoradas de lipossomas (vesículas esféricas com uma membrana composta por uma bicamada fosfolipídica e colesterol) ou niosomas (vesículas de surfactantes não iônicos formadas em meios aquosos com ou sem a presença de colesterol ou outros lipídeos). O novasomas também podem encapsular moléculas

de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos com melhor atividade intrínseca devido à presença de moléculas de surfactantes não iônicos (WAGHMARE; PATIL; PATIL, 2016).

2.4.1.7 Emulsomas

Emulsomas são sistemas vesiculares nanométricos compostos de núcleo lipídico sólido ou semissólido encerrado em várias bicamadas de fosfolípidos que proporcionam estabilidade na forma de emulsão O/A (óleo em água) (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017).

Os emulsomas são mais estáveis que os lipossomas ou outros sistemas vesiculares de liberação de fármacos, impedem a agregação e baixa suscetibilidade à hidrólise e oxidação (JOS; KRISHNAKUMAR; DINESHKUMAR, 2019).

Embora as emulsões tenham um núcleo fluido, os emulsomas possuem um núcleo de lipídeo sólido que fornece liberação prolongada dos princípios ativos encapsulados e uma maior eficiência de encapsulação para compostos lipofílicos. Emulsomas também possuem uma composição de membranas comparável com os lipossomas, com vantagens de direcionar fármacos e proporcionar a sua liberação prolongada (JOS; KRISHNAKUMAR; DINESHKUMAR, 2019).

As formulações emulsomais são estabilizadas por colesterol e lecitina de soja. Pode encapsular fármacos solúveis em água nos compartimentos aquosos das camadas externas fosfolipídicas, enquanto seus núcleos podem ser carregados com altos níveis de drogas hidrofóbicas. Assim, os emulsomas aumentam a solubilidade e melhoram a biodisponibilidade dos fármacos lipofílicos e facilitam a liberação sustentada e controlada (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017; JOS; KRISHNAKUMAR; DINESHKUMAR, 2019).

2.4.1.8 Bilosomas

Bilosomas consistem em sais biliares incorporados na membrana dos niossomas, representando uma nova forma de sistema de liberação de fármacos (EL-NABARAWI et al., 2019). Os sais biliares são surfactantes endógenos amplamente empregados como intensificadores de absorção para melhorar o transporte de princípios ativos nas membranas biológicas, através do aprimoramento da solubilidade de moléculas hidrofóbicas e do aumento da fluidez das membranas (EL-NABARAWI et al., 2019).

Essa estrutura vesicular baseada em lipossomas e enriquecida com surfactantes não iônicos e sais biliares foi desenvolvida inicialmente para a administração oral de vacina

(CONACHER; ALEXANDER; BREWER, 2001). Normalmente, os bilosomas são vesículas fechadas em duas camadas de anfifílico não iônicos semelhantes aos niossomas, mas que integram sais biliares (AL-MAHALLAWI; ABDELBARY; ABURAHMA, 2015). Os bilosomas diferem dos lipossomos e niossomas em termos de composição, estabilidade química e condições de armazenamento (AZIZ; ABDELBARY; ELASSASY, 2019).

A aplicação de bilosomas tem sido investigada com sucesso na administração transdérmica/cutânea de fármacos como a dapsona, diacereína e tenoxicam (AL-MAHALLAWI; ABDELBARY; ABURAHMA, 2015; AZIZ; ABDELBARY; ELASSASY, 2019; EL-NABARAWI et al., 2019).

2.4.1.9 Eritrosoma

Eritrosoma é uma abordagem aplicada à liberação de fármacos tendo como sistema transportador os eritrócitos (DEY et al., 2019). Os eritrócitos como sistema de liberação de fármacos são preparados simplesmente coletando amostras de sangue do organismo de interesse, separando os eritrócitos do plasma, lizando as células por métodos químicos ou físicos, encapsulando o fármaco nos eritrócitos e selando novamente o portador celular resultante (HIRLEKAR et al., 2008).

Quando a maior parte da hemoglobina dos eritrócitos e outros conteúdos celulares são retidos, as células na nova vedação perdem algumas das propriedades dos eritrócitos normais e são chamadas de “eritrócitos manipulados” ou “eritrócitos resselados” (HAMIDI; TAJERZADEH, 2003).

Os eritrosomas apresentam muitas vantagens como um sistema de liberação de fármacos que inclui: biocompatibilidade; biodegradabilidade; incorporação de grande variedade de agentes bioativos; circulação por todo o sistema circulatório; encapsulamento de grande quantidade de fármaco no pequeno volume de células; especificidade direcionada no sistema reticuloendotelial; proteção contra a degradação; inativação e excreção de proteínas e enzimas; atividade sistêmica prolongada pelo longo tempo de permanência no corpo (HAMIDI; TAJERZADEH, 2003).

Dentre as desvantagens, pode-se citar: são removidos pelo sistema reticuloendotelial, limitando a vida útil, podendo representar problemas toxicológicos; possibilidade de aglomeração de células e liberação de uma dose elevada; rápida liberação de certas substâncias encapsuladas nos eritrócitos; moléculas podem alterar a fisiologia do eritrócito; por serem de origem biológica, os eritrócitos encapsulados podem apresentar maior variabilidade e menor

padronização em sua preparação, em comparação com outros sistemas portadores (HAMIDI; TAJERZADEH, 2003; HIRLEKAR et al., 2008).

2.4.1.10 Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas são sistemas de liberação de fármacos que consistem, geralmente, em um núcleo magnético. A propriedade exclusiva da nanopartícula magnética permite que ela seja utilizada para terapia medicamentosa e genética direcionadas. Óxidos de ferro superparamagnéticos também são usados para atingir células cancerígenas por meio de direcionamento passivo (LIU et al., 2019).

Exemplos de nanopartículas magnéticas são a hematita, maghemita, nanoferritos e magnetita. No entanto, existe um problema na penetração profunda do campo magnético nos modelos animais, fornecendo, portanto, uma desvantagem em usar nanocarreadores magnéticos apenas nos alvos próximos ao corpo (CHAMUNDEESWARI; JESLIN; VERMA, 2018).

O uso efetivo de nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas, como a administração direcionada de fármacos depende de vários fatores relacionados ao tamanho e magnetismo das nanopartículas biocompatíveis. Parâmetros como as propriedades físico-químicas das nanopartículas magnéticas carregados com fármacos, força e geometria do campo, profundidade do tecido alvo, taxa de fluxo sanguíneo e suprimento vascular, todos desempenham um papel na determinação da eficácia desse método de administração de medicamentos (CHOMOUCKA et al., 2010).

As nanopartículas magnéticas exibem uma grande variedade de atributos, o que os torna sistema de liberação de fármacos altamente promissores. Em particular, são eles: manipulação fácil com o auxílio de um campo magnético externo, possibilidade de usar estratégias passivas e ativas de administração de fármacos, capacidade de visualização (as nanopartículas magnéticas são usadas na ressonância magnética) e captação aprimorada pelo tecido alvo, resultam em tratamento eficaz nas doses terapeuticamente ideais (WILCZEWSKA et al., 2012).

2.4.1.11 Nanogéis

Nanogéis são definidos como nanopartículas de hidrogel com faixa de tamanho ajustável entre 100 a 1000 nm, formado por redes de polímeros hidrofílicos reticulados, seja por processo químico (covalente) ou físico (Van der Waals e ligação eletrostática). Os nanogéis podem intumescer em meio hidrofílico e têm a capacidade de reter grande quantidade de água

e moléculas de fármacos (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018; DILNAWAZ; ACHARYA; SAHOO, 2018). A rede reticulada do nanogel permite a encapsulação de fármacos, proteínas, DNA e fornece uma grande área de superfície para bioconjugação multivariada de moléculas (QURESHI; KHATOON, 2019).

Essas biomoléculas são absorvidas através de pontes salinas, ligações de hidrogênio e forças hidrofílicas-hidrofóbicas de cadeias de polímeros. Eles podem ter uma estrutura química ajustável para permitir o controle da captação de água, resistência mecânica e biocompatibilidade (MOYA-ORTEGA et al., 2012).

Os nanogéis são capazes de mostrar uma resposta mais rápida a estímulos externos, como exposição à luz, pH, força iônica, temperatura e campos magnéticos por uma alteração no volume, captação de água, índice de refração, hidrofiliicidade e hidrofobicidade (QURESHI; KHATOON, 2019).

A funcionalidade dos nanogéis pode ser feita através de alterações na polimerização das redes reticuladas ou adicionando outra molécula na superfície do nanogel, o que pode tornar o nanogel sensível aos estímulos desejados (QURESHI; KHATOON, 2019). O nanogéis também mostram propriedades distintas como: atravessar as barreiras biológicas, rede interior hidrofílica para encapsulamento e liberação de fármacos (ECKMANN et al., 2014).

Os nanogéis exibem várias vantagens na liberação de fármacos quando comparados a outros sistemas, isso inclui a capacidade de reduzir efeitos fora do local, prolongar o tempo de circulação do fármaco devido à alta estabilidade em comparação com as micelas, controlar a liberação do fármaco, direcionar o fármaco para tecidos específicos através da conjugação da superfície do nanogel com ligantes de afinidade, fornecer proteção para a moléculas encapsuladas contra rápida degradação e facilitar a passagem por barreiras teciduais (ECKMANN et al., 2014; QURESHI; KHATOON, 2019).

Devido à sua estrutura físico-química única, os nanogéis também podem ser desenvolvidos para possuir uma série de características especiais, como (i) deformabilidade para melhorar a ligação e retenção no tecido alvo; (ii) maior estabilidade através de sua estrutura reticulada para prolongar seu tempo de circulação na corrente sanguínea; (iii) uma estrutura núcleo-invólucro com uma rede interior hidrofílica, que permite a encapsulação de fármacos com moléculas pequenas ou biomacromoléculas e a proteção de compostos hidrofílicos; e (iv) perfis modulares de encapsulação e liberação de fármacos, que podem melhorar significativamente a eficiência de encapsulação, bem como biodisponibilidade, reduzindo assim a toxicidade e efeitos colaterais do fármaco (ECKMANN et al., 2014; QURESHI; KHATOON, 2019).

2.4.1.12 Nanopartículas lipídicas sólidas

Inspirado pelas propriedades de nanocarreadores como NLS, CLN, lipossomas, niosomas, etosomas, transferosomas, microemulsões, emulsionantes, dendrímeros e micelas, vários estudos vêm sendo realizados na encapsulação de fármacos com atividade nas doenças hiperproliferativas, especialmente a psoríase (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017; SANTOS et al., 2013).

Dentre os carreadores coloidais lipídicos, as NLS destacam-se visto que apresentam vantagens em relação aos outros carreadores de fármacos para aplicação sobre a pele, como: alta estabilidade, são estruturados à base de lipídeos biodegradáveis, biocompatíveis; apresentam menor citotoxicidade, não usam solventes orgânicos no processo de produção, formam filmes lipídicos, têm alta capacidade de carrear fármacos lipofílicos com controle da sua liberação, amplo espectro de aplicação potencial (oral, dérmico, intravenoso, etc.), boa escalabilidade de produção tornando-os atraentes para as indústrias farmacêutica e cosmética (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER et al., 2007; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015; GARCÊS et al., 2018).

Na década de 1990, Müller e colaboradores desenvolveram a primeira geração de nanopartículas lipídicas, chamada de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), utilizadas como sistemas de liberação alternativos aos veículos coloidais tradicionais, tais como emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas. Nas NLS, o óleo da emulsão foi substituído por um lipídeo sólido ou uma mistura de lipídeos sólidos, tornando assim a matriz lipídica da NLS sólida à temperatura ambiente e corporal, e estabilizada por tensoativos. NLS são compostos de 0,1-30% (m/m) de lipídeos dispersos numa solução aquosa contendo 0,5-5% (m/m) de tensoativos como agente estabilizante (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; SCHWARZ et al., 1994; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014; CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Os lipídeos utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras. As NLS podem ser preparadas por diferentes técnicas como, por exemplo, microemulsificação a quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, *nanospray-drying* e homogeneização a alta pressão (GARCÊS et al., 2018; MARCATO, 2009).

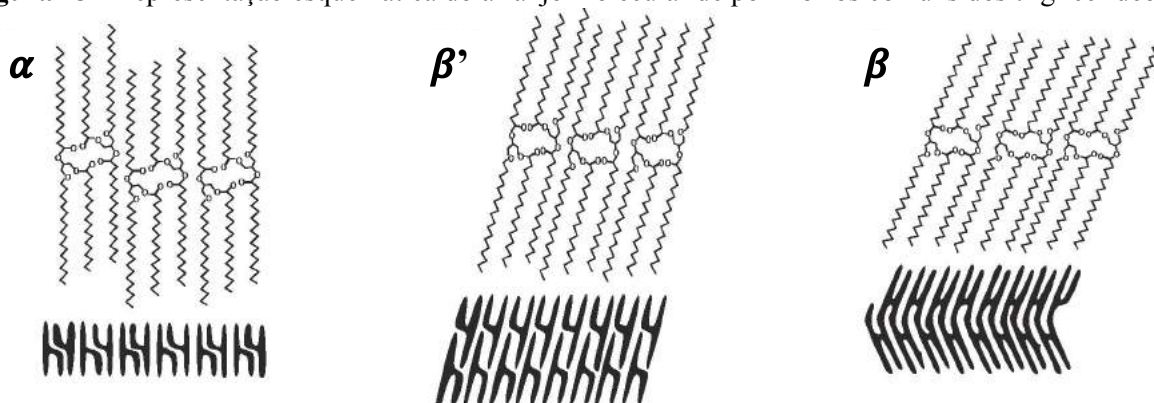
O diâmetro médio das NLS varia de aproximadamente 40 a 1000 nm e combinam vantagens dos sistemas tradicionais, mas evitam algumas de suas desvantagens principais. NLS proporcionam as seguintes características: estabilidade física, facilidade no preparo, proteção do fármaco contra degradação, liberação controlada e baixa citotoxicidade, se utilizados

excipientes bem tolerados (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; YADAV; KHATAK; SARA, 2013).

Além disso, a produção de NLS pode ser realizada sem solvente orgânico e pode ser facilmente escalonada, por exemplo, por homogeneização a alta pressão. A maior desvantagem da NLS é a expulsão do fármaco durante o armazenamento (MEHNERT; MÄDER, 2012).

No período de estocagem, o lipídeo que compõe as nanopartículas pode sofrer uma transformação em sua estrutura cristalina, caracterizada pela transição da forma cristalina α ou β' (menos organizada) de alta energia termodinâmica, para a forma cristalina β (mais organizada) (figura 13) (MUCHOW; MAINCENT; MÜLLER, 2008).

Figura 13 - Representação esquemática do arranjo molecular de polimorfos comuns dos triglicerídeos.



Fonte: Adaptado de Bunjes; Unruh, 2007; Tran; Rousseau, 2016.

Esta mudança na estrutura cristalina do lipídeo ocorre, pois, a forma β é energeticamente mais estável (termodinamicamente estável). Com o tempo, este aumento da transição para a forma β resulta na formação de uma estrutura mais cristalina cujo número de imperfeições é menor e, conseqüentemente, o espaço para acomodar o fármaco é reduzido, o que leva a expulsão do ativo. Cristais lipídicos perfeitos podem ser formados quando as moléculas lipídicas são quimicamente idênticas (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

2.4.1.13 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Para superar os problemas relacionados à expulsão do fármaco nas NLS, desenvolveu-se a segunda geração de nanopartículas lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Estes nanossistemas lipídicos foram introduzidos na literatura por Müller e

colaboradores no final da década de 90 e é um dos nanocarreadores com menor tempo entre invenção e introdução no mercado (BELOQUI et al., 2016).

O primeiro uso de um CLN foi descrito para encapsulação do retinol, substância degradada por agentes oxidantes e luz (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Outros estudos foram realizados confirmando a aplicabilidade dos CLN como sistema de liberação para muitos fármacos (BELOQUI et al., 2016).

As moléculas de ativos também podem ser encapsuladas dentro de um CLN para diferentes vias de administração: oral (etoposídeo, fenofibrato, lovastatina, espironolactona) (BELOQUI et al., 2014; CHEN et al., 2010; TRAN et al., 2014; ZHANG et al., 2011); intravenosa (artemeter, bufadienolidos, β -elemeno) (LI et al., 2010; SHI et al., 2013); pulmonar (celocoxibe, dexametasona, itraconazol, montelucaste) (PARDEIKE et al., 2011; PATIL-GADHE; POKHARKAR, 2014; PATLOLLA et al., 2010; ZHAO et al., 2013); ocular (ciclosporina A, flurbiprofeno, ibuprofeno, ofloxacina) (GONZALEZ-MIRA et al., 2012; LI et al., 2008; SHEN et al., 2009; SHEN et al., 2010; TIAN et al., 2012; USTÜNDAG-OKUR et al., 2014).

Os CLN possuem uma matriz lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal que consiste numa mistura entre lipídeo sólido e lipídeo líquido, preferivelmente numa proporção de 70:30 até uma razão de 99,9:0,1. Através da mistura de diferentes tipos de lipídeos, uma matriz lipídica menos ordenada com mais espaços para compostos ativos é alcançada (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

O tamanho médio de partícula dos CLN assim como nas NLS está na faixa de 40 a 1000nm. Os CLN apresentam muitas vantagens comuns às NLS como sistema transportador para aplicação dérmica, tais como a composição de lipídeos biodegradáveis bem tolerados, propriedades oclusivas sem aparência brilhante da pele, estabilidade de compostos ativos sensíveis à luz, oxidação ou hidrólise, perfis de liberação controlada, aumento da penetração de compostos ativos na pele, bem como direcionamento de fármacos na pele ou mesmo em subestruturas (PARDEIKE; SCHWABE; MÜLLER, 2010).

A vantagem da tecnologia de segunda geração de nanopartículas lipídicas é o aumento da encapsulação de ativos em comparação com o NLS e inclusão mais firme do fármaco dentro da matriz de partículas durante a vida útil (MÜLLER et al., 2007).

Ao preparar as partículas a partir de um lipídio sólido, especialmente lipídeos sólidos altamente purificados, como é o caso das NLS, a matriz de partículas tende a formar uma estrutura cristalina relativamente perfeita, deixando espaço limitado para acomodar o ativo. Isso limita a capacidade de encapsulação e pode levar à expulsão de ativos da matriz lipídica durante

o armazenamento. Por outro lado, o uso de uma mistura lipídica com moléculas muito estruturadas (de tamanho) distorce a formação de um cristal perfeito, o que é observado nos CLN. A matriz de partículas contém muitas imperfeições, proporcionando espaço para acomodar os ativos na forma molecular ou como aglomerados amorfos (MÜLLER et al., 2007; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Müller et al., (2007) afirmam que “a perfeição” do sistema CLN é sua “imperfeição” em sua estrutura cristalina.

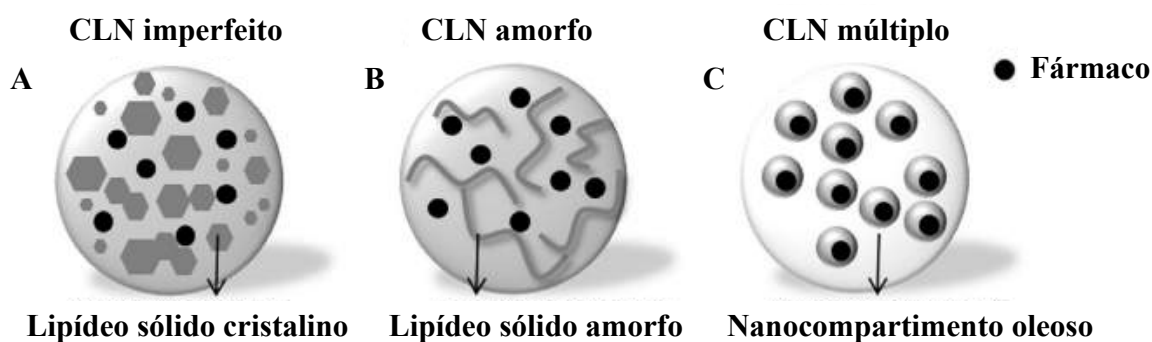
Os CLN são divididos em três diferentes tipos (figura 14) (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; KAUR et al., 2015; MARCATO, 2009):

CLN imperfeito: consiste na mistura de lipídeos com tamanhos e formas diferentes, compostos por diferentes ácidos graxos. Imperfeições na matriz lipídica, devido a diferentes cadeias de ácidos graxos, geram mais espaço para acomodar mais ativo aumentando, desta maneira, a eficiência de encapsulação.

CLN amorfo: Este tipo de CLN é conseguido misturando lipídeos sólidos com lipídeos líquidos. Dessa forma, a expulsão do fármaco durante o armazenamento é impedida pela estrutura especial da matriz lipídica uma vez que os CLN estão sólidos num estado amorfo, mas não cristalino.

CLN múltiplo: Neste modelo, a solubilidade das moléculas de óleo no lipídeo sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida.

Figura 14 - Esquematização estrutural dos CLN: (A) imperfeito, (B) amorfo, (C) múltiplo.



Fonte: Adaptado de Czajkowska-Kosnik; Szekalska; Winnicka, 2019.

A penetração de fármaco após aplicação tópica de um CLN é condicionada por muitos fatores, tais como o tipo e concentração de lipídeos e surfactantes, localização do fármaco e o método de produção (SALA et al., 2018).

O CLN altera o empacotamento intercelular como resultado de uma redução do rearranjo de corneócitos e de extensão dos interstícios inter-corneócitos (SALA et al., 2018). O mecanismo de liberação do fármaco a partir de um CLN consiste na difusão e degradação das partículas lipídicas na pele. Após a fixação e adesividade dos CLN à superfície da pele, os CLN podem perturbar o EC através de diferentes mecanismos, tais como trocas lipídicas ou desorganização da estrutura lipídica intercelular, alteração da polaridade, fluidização do EC após um aumento da hidratação (ZHAI; ZHAI, 2014).

O perfil de liberação do fármaco a partir de nanopartículas lipídicas pode ser modificado de acordo com a composição da matriz lipídica, concentração de tensoativo e parâmetros de produção (tempo, pressão, temperatura) (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

O uso cutâneo de nanopartículas lipídicas apresenta várias vantagens, como a proteção química das substâncias incorporadas, permitindo a aplicação na pele de moléculas lábeis de difícil transporte em formulações semissólidas tradicionais; disponibilidade tópica de fármacos melhorada, relacionada com a possibilidade de modular a liberação de moléculas, promovendo a sua penetração e retenção na pele (GARCÊS et al., 2018).

Essas propriedades estão relacionadas à composição lipídica fisiológica das NLS e dos CLN que podem interagir com o EC. Além disso, o tamanho pequeno das nanopartículas também contribui para aumentar sua adesividade e superfície de contato, promovendo o influxo de fármaco na pele (BELOQUI et al., 2016). Não obstante, é importante ter em mente que as propriedades físico-químicas das moléculas também desempenham um papel importante da penetração na pele (BELOQUI et al., 2016; GARCÊS et al., 2018; KIM et al., 2017; SALA et al., 2018) (figura 15).

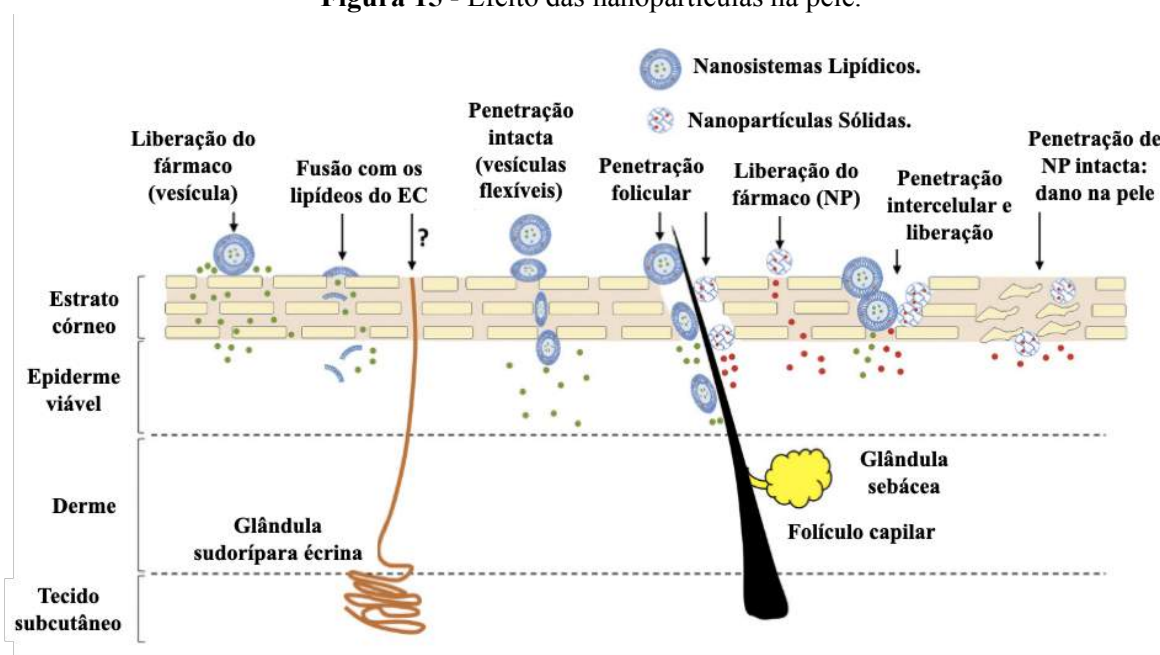
Müller e colaboradores sugeriram que a aplicação cutânea de nanossistemas lipídicos promove a hidratação da pele por dois mecanismos (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; MÜLLER; SHEGOKAR; KECK, 2011):

- i) formação de um filme oclusivo na superfície do EC que evita a perda de água (evaporação), evitando a perda de água transepidérmica;
- ii) reforço da barreira do filme lipídico da pele pela adesão de nanopartículas ao EC.

Além disso, o alto tamanho das nanopartículas na faixa nanométrica (>100 nm) também poderia contribuir para a retenção das moléculas da pele (GARCÊS et al., 2018).

Porém, para alcançar a absorção sistêmica através da pele, os nanossistemas devem ter tamanhos pequenos (<100 nm) ou estar associados a métodos de penetração na pele que superem a barreira do EC (GARCÊS et al., 2018).

Figura 15 - Efeito das nanopartículas na pele.



Fonte: Adaptado de Roberts et al., 2017.

Os CLN têm a capacidade de imobilizar fortemente o fármaco encapsulado, assim como impedir que as partículas se coalesçam em virtude da matriz sólida quando em comparação com as emulsões (LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO, 2015). Além disso, as gotas de lipídeo líquido na matriz sólida aumentam a capacidade de encapsulação do fármaco em comparação com as NLS (IQBAL et al., 2012).

Recentemente, os CLN têm sido intensamente estudados como portadores de administração de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os CLN foram desenvolvidos com uma perspectiva para atender às necessidades industriais em termos de qualificação e validação, escalonamento, tecnologia simples e baixo custo (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

Em adição, os CLN se mostraram uma alternativa viável para o tratamento de afecções da pele, por via tópica, pois são mais eficazes na entrega e proteção do fármaco, especialmente os lipofílicos, aumento da retenção e permeação cutânea, por causar oclusão do EC (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016), além de reduzir efeitos colaterais relacionados à toxicidade dos diversos ativos (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

2.4.2 Sistema nanotecnológicos veiculando tacrolimus

O Tac tem sido amplamente explorado em problemas de pele e relacionados à pele. Muitos grupos de pesquisa estão trabalhando nessa área, principalmente no uso de sistemas de liberação (DHEER et al., 2018).

Lapteva et al., em 2014 formularam o Tac em micelas poliméricas que incorporam o copolímero de dibloco PLA substituído por mPEG-di-hexil. Os pesquisadores investigaram ainda mais sua perspectiva de liberação através da camada da derme. Experimentos de administração de fármacos usando pele humana demonstraram que essa formulação ($1,50 \pm 0,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) observou maior deposição do Tac na camada dérmica em comparação com a pomada comercializada Protopic® (Tac a 0,1% p/p) ($0,47 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Patel et al., (2010) desenvolveram lipossoma contendo Tac e veiculados em gel para dermatite atópica. Tac lipossômico tópico com radiomarcadores foi testado em modelo murino *in vivo*, foi observado que as concentrações dérmicas eram aumentadas do Tac em comparação com a fármaco livre e provam ser um sistema de liberação benéfico para a psoríase.

Em 2012 foi realizado um estudo comparativo para formulações lipossômicas clássicas e agora etossômicas contendo Tac como um fármaco lipofílico para verificar a permeação de ativos para administração tópica. De acordo com a literatura, o etanol tem um papel predominante nos sistemas etossômicos, já que o etanol em sistemas lipossômicos convencionais produz vesículas sensíveis, compactas e transformáveis. Pioneira no conceito, observou-se que a presença de etanol no compartimento aquoso das vesículas favoreceu o encapsulamento do Tac (LI et al., 2012).

Tac foi encapsulado em transferosomas que foram investigados para melhorar a penetração na pele, conseqüentemente, melhorando o efeito farmacológico *in vivo* na dermatite atópica comparado com a pomada comercial protopic® e um gel lipossomal contendo Tac. Os autores usaram diferentes tipos de surfactantes para preparar os tranferosomas, como o colato de sódio, tween® 80 e span® 80. O tranferosoma obtido com o tween® 80 foi o tensoativo ideal devido à melhor deformabilidade e às maiores retenções de fármaco. Os tranferosomas otimizados foram veículas em gel (TFs-gel) e a liberação *in vitro* após 24h foi maior que a pomada comercial. A liberação cumulativa do Tac a partir de TFs-gel após 12h *in vitro* foi de 37,6%. O TFs-gel otimizado apresentou retenções cutâneas do Tac notavelmente mais altas quando comparadas com lipossomas-gel e pomada comercial em experimentos de retenção de pele *in vivo*. As quantidades de Tac na epiderme e derme dos TFs-gel foram 3,8 e 4,2 vezes, respectivamente, comparado com a pomada comercial. Enquanto os lipossomas-gel foram de apenas 1,7 e 1,4 vezes, respectivamente, em comparação com a pomada. A aplicação tópica de

TFs-gel apresentou o melhor efeito terapêutico na dermatite atópica de camundongos induzida pela aplicação tópica repetida de 2,4-dinitrofluorobenzeno (LEI et al., 2013).

Müller et al., (2017) desenvolveram nanopartículas a partir de ramnolipídeos, um biosurfactante biodegradável, secretado pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que permitem que o microrganismo produtor possa solubilizar e absorver moléculas hidrofóbicas como hidrocarbonetos, utilizando-as eficientemente como fonte de carbono. As nanopartículas de ramnolipídeos contendo Tac foram produzidas através da ultra-sonicação e filtração. O tamanho das nanopartículas contendo Tac ficou na faixa de 40 a 60 nm. A eficiência de encapsulação do tacrolimus nas nanopartículas de ramnolipídeos foi de até 30% p/p. A liberação do Tac em modelo de pele usando o vermelho do Nilo usando amostras de pele humana na célula Franz, seguida por microscopia de fluorescência em cortes histológicos mostrou que o corante fluorescente corou intensamente o estrato córneo, e que uma menor concentração do Tac penetrou na epiderme. O efeito tóxico dos ramnolipídeos em fibroblastos humanos, através de observações experimentais de proliferação celular com ramnolipídeos em concentrações superiores aos valores da concentração micelar crítica dos biosurfactantes, não demonstraram efeitos tóxicos.

Um sistema híbrido baseado em nicotinamida (NIC) e nanopartículas (NPs) que encapsulam o Tac, como o FK506-NPs-NIC, foi desenvolvido para facilitar a entrega percutânea do fármaco, explorando as propriedades do NIC e do NP para obter um efeito sinérgico. Foram realizados estudos de solubilidade e permeação percutânea. Os resultados mostraram que a NIC poderia aumentar a solubilidade e a permeabilidade do Tac e que a NIC a 20% (p/v) apresentava maior permeabilidade ao fármaco e, portanto, foi escolhido como a solução hidrotrópica para solubilizá-lo e preparar o FK506-NPs-NIC. O ácido hialurônico (HA) foi quimicamente conjugado com colesterol (Chol) para obter o conjugado anfifílico de HA-Chol, que montou NPs em solução NIC a 20% contendo Tac. O trabalho demonstrou que a solubilização hidrotrópica de Tac foi prontamente encapsulado em NPs com uma eficiência de encapsulamento mais alta de $79,2\% \pm 4,2\%$, e a combinação de NPs com NIC exibiu um efeito sinérgico significativo na deposição do Tac na pele ($2,39 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e penetração na pele ($13,38 \pm 2,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). O efeito da combinação de NPs com NIC na permeação do fármaco foi visualizado pelo microscópio confocal de varredura a laser através de estudos de permeação *in vivo*, e os resultados confirmaram que o NPs-NIC aumentou sinergicamente a permeação do fármaco na pele. A captação celular realizada nas células HaCaT apresentou um efeito promotor de NPs na captação celular. O estudo demonstrou que o HA-Chol-NPs-NIC pode melhorar sinergicamente a entrega percutânea do Tac, e é uma nova estratégia potencial baseada em

sistemas de liberação de fármacos de tamanho nanométrico para tratar doenças de pele (PAN et al., 2016).

Gabriel et al., (2016) veicularam nanopartículas contendo Tac à base de metoxi poli (etilenoglicol) hexil substituídos por poli (ácido láctico) (mPEGhexPLA) em hidrogel à base de carbopol®. As nanopartículas contendo Tac veiculadas no hidrogel foram projetadas para ter propriedades superiores à formulação farmacêutica atualmente disponíveis com base em parafina. As formulações compostas de hidrogel apresentaram boa tolerância local e não mostraram sinais de toxicidade imediata após administração tópica repetida em camundongos saudáveis. Verificou-se que a distribuição cutânea de hidrogel composto por nanopartícula contendo Tac em um modelo de camundongo com psoríase induzida por imiquimode era duas vezes maior que a formulação comercial Protopic®, usada como referência. O hidrogel mostrou melhora significativa nas características *in vivo* e histopatológicas do modelo de psoríase induzida por imiquimode.

Em outro estudo, foram preparadas formulações tópicas de hidrogel contendo Tac compostas de carbômero, carnosina, transcutol® P (éter dietilenoglicol monoetilico) e umectante. Para comparação, também foram preparadas formulações tópicas do tipo creme contendo Tac e a pomada comercialmente disponível (protopic®), usada como referência. O estudo de liberação de fármacos *in vitro* revelou que a quantidade total de Tac liberada a partir de hidrogéis por 24 h era aproximadamente 30 vezes maior que a da formulação de referência. Comparadas às pomadas e cremes de referência, as formulações de gel de carbômero mostraram maior permeação e retenção de Tac na pele (significativamente diferentes em $p < 0,05$), especialmente aqueles com mais de 10% de transcutol® P. Os autores concluíram que as formulações de gel de carbômero com níveis suficientes de transcutol® P são boas candidatas à administração cutânea de Tac e têm potencial como agentes terapêuticos para o tratamento de dermatite atópica ou distúrbios imunológicos da pele (LEE et al., 2016).

Jain et al., (2016) desenvolveram liposferas contendo uma combinação de Tac e curcumina (Cur) com um tamanho de partícula de quase 50 nm e incorporadas a um gel para aplicação tópica. O gel de liposfera mostrou liberação lenta de ambos os fármacos, 55% do Tac e 20% da curcumina foram liberados da formulação gel Tac-Cur liposferas em 24h. O gel Tac-Cur apresentou comportamento pseudoplástico por cisalhamento, que é propriedade desejável da formulação tópica. Além disso, o estudo da distribuição dérmica usando formulação marcada com corante sugeriu a penetração do corante nas camadas da pele. A eficácia terapêutica do gel de liposfera carregada com Tac e curcumina foi avaliada no modelo de placa psoriática induzida por imiquimode, e o nível de expressão de marcadores bioquímicos psoriáticos foi avaliado

usando o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA). Os resultados indicaram melhora nas características fenotípicas e histopatológicas da pele psoriática tratada com gel de liposfera contendo Tac e curcumina. Houve redução no nível de TNF- α , IL-17 e IL-22 em comparação ao grupo imiquimode. Os autores concluíram que os resultados corroboram a premissa de que o gel de liposfera contendo combinação de Tac e curcumina pode ser uma estratégia eficaz para o tratamento da psoríase.

Pople e Singh (2010) desenvolveram NLS contendo Tac (NLS-T) incorporado em géis de Carbopol® 980. Estudos de liberação *in vitro* mostraram que o NLS-T teve uma liberação inicial imediata (até 8 horas) seguida de liberação prolongada por até 48 horas. A pomada comercial teve uma liberação muito menor e muito lenta ao longo do período. Os estudos de permeação *in vitro* mostraram que a penetração do Tac na pele da orelha do porco do NLS-T foi de 16 a 21 vezes maior que a da pomada comercial, um efeito que pode ser atribuído ao aumento da liberação do fármaco. Estudos de retenção *in vivo* foram realizados para determinar a localização do Tac nas diferentes camadas da pele. Observou-se que os níveis de Tac do gel contendo NLS-T no EC, EP e DE foram 3,36, 30,81 e 28,68 vezes maiores, respectivamente, do que a pomada comercial. Estudos de irritação da pele usando coelhos mostraram sinais de irritação com a pomada comercial, tanto na pele intacta quanto na pele irritada. Porém, o NLS-T veiculado no gel não causou eritema ou edema na pele intacta e irritada (POPLE; SINGH, 2010). Segundo os autores, a encapsulação do Tac em NLS pode ser uma forma de reduzir a irritação da pele causada pelo fármaco na pomada comercial.

Nam e colaboradores (2011) encapsularam o Tac em CLN e NLS. Os autores desenvolveram e caracterizaram as nanopartículas baseada em lipídeos carreando Tac pela técnica de homogeneização a quente e sonicação para aplicação tópica. Os estudos foram conduzidos para avaliar a eficácia desses nanossistemas em melhorar a taxa de penetração na pele de camundongos *hairless*. Os CLN e as NLS, respectivamente, apresentaram um tamanho médio de $123,4 \pm 0,3$ nm e $126,7 \pm 1,6$ nm, PZ de $-24,3 \pm 6,2$ mV e $-27,5 \pm 5,3$ mV e uma EE de 50% e 45%. A EE% foi bem abaixo do esperado para fármacos lipofílicos. Os testes de penetração *in vitro* foram realizados apenas com os CLN, pois a taxa de liberação do Tac nas NLS foi bem elevada. Os dados revelaram que os CLN carregados com Tac apresentaram uma taxa de penetração 1,64 vezes maior do que a pomada Protopic®, que é uma pomada dérmica comercial contendo Tac. Os autores concluíram que os CLN carregados com Tac foram totalmente preparados por um método simples de sonicação. A taxa de penetração desses CLN através da pele de um camundongo sem pelo foi maior do que o Protopic®. Os resultados

sugerem que os CLN carregados com Tac têm um potencial significativo para utilização como uma formulação tópica alternativa para o fármaco.

Pople e Singh (2011) melhoraram a baixa solubilidade do Tac e subsequente baixa biodisponibilidade *in vivo* pela formulação de um carreador nanolipídico modificado (CNLM) usando monocaprilato de propilenoglicol e trimiristato de glicerila. A modificação lipídica resultou em alta eficiência de encapsulação do Tac (96,66%) e uma redução na concentração lipídica total na estabilidade do CNLM. Uma liberação de fármaco *in vitro* consideravelmente maior, permeação percutânea maior com menos irritação cutânea foi obtida com os CNLM veiculados em géis em comparação com o controle. Utilizando a cintilografia gama em ratos, confirmou-se o efeito de aumento de penetração *in vivo* desse transportador, uma vez que a radioatividade penetrada registrada na pele foi de 41,13% após 4h de aplicação em comparação com a pomada referência (23,72%). Concluiu-se que o CNLM carregado com Tac formado com solubilizadores lipofílicos aumentou a eficiência de encapsulação dos nanotransportadores lipídicos com melhora significativa da estabilidade e localização da pele.

Tac foi encapsulado em nanopartículas líquidas cristalinas (NPLC) por Thapa et al., (2013) para uso na psoríase como nova abordagem no campo de administração controlada de fármaco. Os autores prepararam as NPLC usando monoleína, água destilada e diferentes proporções do tensoativo poloxamer® 407. As NPLC foram caracterizadas, incluindo imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), tamanho de partícula e eficiência de encapsulação. As análises sugeriram a formação de cubossomos com um tamanho de partícula variando de 140 a 155 nm e nível de aprisionamento de Tac de até 99% ou mais. Estudos de liberação *in vitro* revelaram uma liberação sustentada de Tac por 2 semanas, com um alto perfil de estabilidade das NPLC e a encapsulação do fármaco durante o período de armazenamento. Os autores concluíram que as propriedades das NPLC desenvolvida contendo Tac podem ser promissoras para o desenvolvimento de formulações para a liberação intradérmica em doenças autoimunes como a psoríase, de modo que a frequência de dosagem e os efeitos adversos possam ser subsequentemente minimizados.

Em trabalho mais recente, Jain et al., (2019) relatam o desenvolvimento, otimização e caracterização de NPLC, NLS, CLN e lipossomas carregados com Tac, todas os sistemas para uso tópico. Os pesquisadores desenvolveram diferentes nanoformulações após triagem de lipídeos e surfactantes adequados. As nanoformulações foram otimizadas (para alcançar maior eficácia de encapsulação, menor D, PDI e PZ), caracterizadas e veiculadas no gel de carbopol® ultrez 10 NF. Os géis com nanoformulações também foram caracterizados, através da reologia e da viscosidade; concomitantemente, foram analisados quanto à liberação *in vitro* do Tac,

estudos de permeação cutânea, estudos de eficácia *in vivo* e estudos de irritação dérmica. As nanoformulações desenvolvidas mostraram tamanho de partícula (<200 nm), índice de polidispersão ($<0,3$), potencial zeta (≥ -10 mV) e eficiência de encapsulação ($> 85\%$). As nanoformulações apresentaram maior penetração de Tac na pele em comparação à pomada comercial (Tacroz® forte) e o Tac livre no gel. Os géis contendo NPLC-Tac, NLS-Tac, CLN-Tac e lipossomas-Tac apresentaram incremento de 14, 11,5, 12,5 e 3,7 vezes na biodisponibilidade dérmica, respectivamente, em comparação com Tac livre no gel e 2,5, 2 e $\cong 2$ vezes aumento na biodisponibilidade dérmica, respectivamente, em comparação com o Tacroz® forte. No caso dos lipossomas-Tac, a biodisponibilidade dérmica foi menor em comparação com a formulação comercializada. Apesar do aumento da biodisponibilidade na pele, os autores ressaltaram que as nanoformulações desenvolvidas não mostraram nenhuma irritação cutânea significativa. Segundo os pesquisadores, as nanoformulações mencionadas foram capazes de alcançar uma maior penetração de Tac na pele em comparação com a pomada Tacroz® forte.

2.4.3 Sistemas nanotecnológicos contendo tacrolimus para tratamento da psoríase

A aplicação tópica de terapias para a psoríase com nanocarreadores cria uma fina película na pele; a inclusão de fármacos dentro de nanossistemas previne a agregação do princípio ativo dentro desse filme, o que é comum com o fármaco livre, resultando em penetração limitada através do EC. Os nanocarreadores dentro do filme criam um alto gradiente de concentração de fármaco na superfície da pele, que impulsiona a difusão sustentada do fármaco. Os nanotransportadores também podem se alojar dentro da matriz lipídica do EC, resultando na liberação lenta e sustentada do fármaco incorporado, bem como na sua retenção na pele por períodos prolongados, em comparação com o fármaco livre (MURPHY; SCHAFFTER; FRIEDMAN, 2019). Além disso, os fármacos encapsulados nos nanocarreadores são protegidos da degradação e sua meia-vida ativa é aumentada (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018).

A liberação sustentada de fármacos e a meia-vida prolongada podem reduzir as doses de fármacos usados em nanocarreadores e o número de aplicações necessárias em comparação com os ativos livres, diminuindo os efeitos colaterais cutâneos e aumentando ainda mais a eficácia. A maior retenção do fármaco oferecida com nanocarreadores também limita os efeitos colaterais sistêmicos, porque o ativo permanece na pele ao invés de ser absorvido no sangue (MURPHY; SCHAFFTER; FRIEDMAN, 2019).

Essas novas estruturas de transportadores são distintas em sua composição e construções, incluindo seu desenho exterior e interior quando comparadas aos sistemas convencionais, como pomadas, cremes e géis (GÜNGÖR; REZIGUE, 2017).

Fazem parte destes nanossistemas, as nanopartículas, os lipossomas, etosomas, niosomas, transferosomas, polimerosomas, nanoemulsões e nanoemulsomas, microemulsões, nanosuspensões, micelas. Com a invenção de novas tecnologias, muitos sistemas transportadores de fármacos estão se desenvolvendo e a demanda por entrega direcionada, como etosomas, emulsomas, eritosomas, nanopartículas magnéticas, novasomas, nanogel e bilosomas estão aumentando (DADWAL; MISHRA; NARANG, 2018; MURPHY; SCHAFFTER; FRIEDMAN, 2019).

Lee e colaboradores (2016) desenvolveram hidrogéis contendo o promotor de permeação cutânea Transcutol® P para veiculação do Tac e obtiveram ótimo resultado de penetração e retenção cutânea do ativo quando comparado ao creme desenvolvido pelos pesquisadores e também quanto comparado a pomada já disponível comercialmente, demonstrando assim o potencial do hidrogel desenvolvido.

Sistemas automicroemulsionáveis (SMEDDS) contendo óleo de arroz para liberação do Tac foram desenvolvidos para uso oral por Pawar e Vavia (2012). Porém, como estabilizante foi utilizado o Cremophor® EL, composto esse conhecido na literatura por sua toxicidade. Assim, os autores concluíram que os SMEDDS enriquecido com o óleo de arroz pode atuar como um potencial excipiente multifuncional para formulações lipídicas.

Lapteva e colaboradores (2014a) desenvolveram micelas poliméricas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis substitutas ao copolímero do ácido polilático para liberação cutânea do Tac para tratamento de psoríase. Porém, foi demonstrado por microscopia confocal que esses nanocarreadores, apesar do diâmetro pequeno (aproximadamente 50 nm), não foram capazes de atravessar o EC, depositando-se nos folículos pilosos.

Thapa et al., (2012) desenvolveram e caracterizaram NPLC contendo monoleína e ácido oleico para liberação do Tac na pele. Os autores obtiveram uma alta eficiência de encapsulação (99%), porém as NPLC apresentaram baixa estabilidade.

Seguindo a mesma linha de trabalho, Thapa et al., (2013) desenvolveram e caracterizaram NPLC contendo monoleína e poloxamer® 407, e avaliaram a liberação de Tac, obtendo altas taxas de encapsulação do fármaco e evidências de estabilidade das nanopartículas em termos de evolução do tamanho durante o período de armazenamento.

Thapa e Yoo (2014) avaliaram o efeito de NPLC contendo Tac em modelos de psoríase. Os autores verificaram que as nanopartículas apresentaram altas taxas de encapsulação (>99%),

a permeação cutânea representou um aumento de seis vezes em relação ao controle. Os coeficientes de fluxo e a permeação no estado estacionário também foram aprimorados mais de dez vezes. Mais de 65% do fármaco foi retido na pele e os nanossistemas contendo Tac foram mais eficazes no tratamento da pele psoriática em comparação com o controle.

Goebel, Neubert e Wohlrab (2011) desenvolveram três microemulsões como sistemas carreadores coloidais em busca do aumento da permeação do Tac na pele de psoriáticos e foi demonstrado em estudos de permeação cutânea que as microemulsões desenvolvidas conseguiram atingir camadas profundas da pele quando em comparação com a pomada já existente para esse fármaco. Os estudos de penetração demonstraram que, em comparação com a pomada veículo padrão, todas as três microemulsões resultaram em maiores concentrações de Tac nas camadas mais profundas da pele, independentemente do tempo de incubação. Os autores concluíram que a porcentagem da quantidade biodisponível de Tac (soma da quantidade encontrada na derme e no compartimento receptor da célula de Franz) das microemulsões chegaram a concentrações de até $20,95 \pm 12,03\%$ após 1000 minutos de tempo de incubação, diferindo significativamente ($p < 0,01$), quando comparada com a pomada comercial, que produziu uma concentração de $6,41 \pm 0,57\%$.

Tac encapsulado em lipossomas foram desenvolvidos para serem avaliados em modelo murino para tratamento de doenças de pele imunomediadas. O nanocarreador foi desenvolvido e pareceu ser promissor, porém, lipossomas são sistemas de difícil escalonamento industrial e apresentaram baixa estabilidade (ERDOGAN; WRIGHT; MCALISTER, 2002).

Nanocarreadores lipídicos modificados utilizando solubilizantes lipídicos foram desenvolvidos por Pople e Singh (2011) para liberação de Tac na pele. Verificou-se que a presença do solubilizante aumentou a eficiência de encapsulação do ativo com melhora de performance em termos de estabilidade e localização na pele.

Liposferas (com diâmetro médio de 50 nm) contendo uma combinação de Tac e curcumina foram desenvolvidas e incorporadas em um gel para aplicação tópica desses ativos para tratamento da psoríase. Esse gel demonstrou uma ótima liberação dos dois ativos assim como uma potencial penetração dos fármacos nas camadas da pele. Em modelo de psoríase induzida por imiquimode, o tratamento promoveu uma redução de citocinas pró-inflamatórias demonstrando o potencial efeito para tratamento da psoríase do gel desenvolvido (JAIN et al., 2016).

Com a mesma ideia de um efeito sinérgico de ativos, Andrade e colaboradores (2017) desenvolveram CLN revestidos ou não com quitosana carregado com Tac e/ou clobetasol para uso tópico com EE de 90%. Por meio dos resultados encontrados, as nanopartículas

apresentaram-se como promissoras para veicular esses ativos, e o clobetasol influenciou diretamente na penetração do Tac, conferindo, portanto, um efeito sinérgico.

Patel et al., (2010) propuseram que, quando o Tac era encapsulado em lipossomas em formulações tópicas aumentava sua penetração através da pele. Relatos com diferentes modelos de estudos de toxicidade evidenciaram que o Tac lipossomal seja menos tóxico que o Tac livre, quando estes são introduzidos no sistema circulatório. Assim, os pacientes que requerem maiores concentrações de pomada em grandes áreas da pele podem usar o Tac lipossômico em vez de livre.

Enquanto as terapias tópicas continuam a servir como primeira linha para o tratamento da psoríase, o arsenal terapêutico atual possui limitações, pois têm o potencial de causar efeitos colaterais cutâneos, como eritema, queimadura e prurido. Embora a pele seja o alvo desejado das terapias tópicas, ela também é uma barreira para a penetração e absorção eficazes dos fármacos, e a hiperproliferação dos queratinócitos associada à psoríase fortalece ainda mais essa barreira (MURPHY; SCHAFFTER; FRIEDMAN, 2019; RAHMAN et al., 2015).

Uma rota promissora para abordar essas questões é através da utilização da nanotecnologia, que fornece mecanismos para aumentar a penetração e diminuir a toxicidade dos fármacos. A tabela 1 apresenta as principais publicações realizadas nos últimos 20 anos com fármacos utilizados na terapia da psoríase que foram veiculados em nanossistemas.

Tabela 1 - Lista de nanocarreadores contendo tacrolimus.

(continua)

Nanocarreador	Referência
Ciclodextrina	(ARIMA et al., 2001); (GAO et al., 2012).
CLN	(NAM; JI; PARK, 2011); (POPLE; SINGH, 2011); (KHAN et al., 2016); (ANDRADE et al., 2017); (DANTAS et al., 2018); (JAIN et al., 2019); (KHAN et al., 2019).
Etosomas	(LI et al., 2012).
Liposferas	(JAIN et al., 2016) (ERDOGAN; WRIGHT; McALISTER, 2002);
Lipossomas	(CHOUGULE; PADHI; MISRA, 2007); (PATEL et al., 2010); (ZHU et al., 2013); (OKUDA et al., 2016); (JAIN et al., 2019).

Tabela 1 - Lista de nanocarreadores contendo tacrolimus.

		(conclusão)
Nanocarreador		Referência
Micelas Poliméricas		(DANE et al., 2011); (WANG et al., 2011); (LAPTEVA et al., 2014); (ALI; FARAH; BINKHATHLAN, 2016); (CONG et al., 2017); (LIU et al., 2019); (YAMAMOTO et al., 2019).
Microemulsão		(GOEBEL; NEUBERT; WOHLRAB, 2011); (SAVIC et al., 2017); (WAN et al., 2017).
Microesferas		(ESHITA et al., 2005); (LAMPRECHT et al., 2005).
Nanocápsulas		(NASSAR et al., 2009); (FRIEDRICH et al., 2014)
Nanoemulsão		(GARG et al., 2013); (SAHU et al., 2018).
Nanogel		(LIMÓN et al., 2019); (RANCAN et al., 2019).
Nanopartícula de Cristais Líquidos		(THAPA et al., 2012, 2013); (THAPA; YOO, 2014); (JAIN et al., 2019).
NLS		(POPLE; SINGH, 2010); (WANG et al., 2012); (DANTAS et al., 2018); (JAIN et al., 2019).
Nanopartículas Sólidas Poliméricas		(ZHAO et al., 2015); (GABRIEL et al., 2016); (SEO et al., 2016); (THAO et al., 2016); (KALAM; ALSHAMSAN, 2017); (ZHUO; ABOUREHAB; HUSSAIN, 2018).
Nanosoma		(ALI et al., 2010).
Niosomas		(ZENG et al., 2016).
Proglícosomas		(GARG et al., 2017).
Sistema Híbrido Nanopartícula-Nicotinamida		(PAN et al., 2016).
Sistema Auto-Emulsionado Supersaturado		(LEE et al., 2016).
Sistema Microemulsionado Automontado		(VIVEK; HEMA; DARSHANA, 2008); (WANG et al., 2011); (PAWAR; VAVIA, 2012); (PATEL et al., 2013); (VON SUESSKIND-SCHWENDI et al., 2013); (PATEL; MEHTA; PANCHAL, 2014).
Transferosomas		(LEI et al., 2013).

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.4.4 Preparação das nanopartículas lipídicas

Existem diversos métodos para produção de nanopartículas lipídicas, que são classificadas em três grupos: métodos baseados em alta energia (homogeneização a alta pressão, ultrasonicação, micro-ondas, fluido supercrítico), métodos baseados em baixa energia (microemulsão, emulsão múltipla, temperatura de inversão de fases, passagem por membranas) e métodos baseados em solventes orgânicos (emulsificação e evaporação do solvente, emulsificação e difusão do solvente e injeção do solvente) (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Porém, os comumente usados para a preparação desses nanocarreadores são a homogeneização a alta pressão a temperaturas elevadas ou baixas (incluindo homogeneização a quente e homogeneização a frio); emulsificação, evaporação ou difusão de solvente; ultrassom ou homogeneização sob alto cisalhamento; microfluidização e ainda secagem por aspersão (BELOQUI et al., 2016, 2017).

2.4.4.1 Homogeneização a alta pressão

A tecnologia de Homogeneização a Alta Pressão (HAP) tem surgido como uma técnica estabelecida e potente para a produção de nanopartículas lipídicas. Em contraste com outras técnicas, é um método que pode ser usado para produção de NLS e CLN em larga escala, ou seja, escalonável. Aqui, a dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade estreita (poucos micrômetros), e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade (cerca de 100 km/h) ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanopartículas com reduzido diâmetro (MEHNERT; MÄDER, 2012; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

A HAP pode acontecer por dois processos: homogeneização a quente ou homogeneização a frio. O ativo farmacêutico é dissolvido ou disperso no lipídeo fundido antes de homogeneizar, em ambos os processos. A homogeneização tem várias vantagens, incluindo produção em grande escala, ausência de solvente orgânico, melhor estabilidade do produto e melhor encapsulação de ativos. Entretanto, a alta temperatura no processo pode aumentar a velocidade de degradação e/ou modificação do ativo e do carreador, enquanto a alta pressão pode ocasionar a coalescência das partículas (BELOQUI et al., 2017).

2.4.4.2 Emulsificação e evaporação de solvente

Neste método, o lipídeo é dissolvido num solvente orgânico imiscível em água. Em seguida, forma-se uma emulsão em uma fase aquosa contendo tensoativo. Para remover o solvente da emulsão, utiliza-se a evaporação sob pressão reduzida. A evaporação leva à dispersão de nanopartículas na fase aquosa (usando o processo de precipitação lipídica na fase aquosa). Uma das vantagens deste método é o encapsulamento de ativos termosensíveis, pois neste método não é utilizado aquecimento na produção das partículas. Entretanto, apresenta desvantagens como, por exemplo, solvente residual na dispersão final e o fato de as dispersões serem muito diluídas, devido à limitada solubilidade do lipídio no solvente orgânico (NASERI et al., 2015). Outra desvantagem é a produção de micropartículas lipídicas e não de nanopartículas, o que pode ser revertido utilizando homogeneização à alta pressão ou ultrassom (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

2.4.4.3 Ultrasonicação ou homogeneização a alto cisalhamento

A homogeneização da fase aquosa com a fase lipídica também pode ser obtida utilizando um processador ultrassônico (sonicador de ponta). Nesta técnica, o ultrassom propaga ondas sonoras na dispersão gerando tensão mecânica suficiente para quebrar as partículas. Esta quebra ocorre pelo processo de cavitação (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). As ondas de choque propagadas pela ruptura das microbolhas exercem um efeito cortante, quebrando as partículas e, conseqüentemente, reduzindo o diâmetro das mesmas. A frequência e a potência utilizadas durante o processo influenciam nas propriedades físicas das partículas (ex., diâmetro e PDI) e no efeito térmico que é resultante da energia dissipada na forma de calor. Este efeito térmico ocasiona o aumento da temperatura do sistema e pode gerar deposição de metais provenientes da haste do sonicador (BELOQUI et al., 2016; SINGH, et al., 2017).

Este método divide-se em duas partes. A primeira parte corresponde à formação de uma emulsão quente. Nesta etapa utiliza-se duas fases imiscíveis, uma aquosa, contendo água e tensoativo e uma oleosa contendo lipídeo. Se o lipídeo é sólido à temperatura ambiente (25°C), as duas fases devem ser aquecidas até completa solubilização ou fusão dos componentes. Em seguida, a fase aquosa é vertida na oleosa sob agitação formando uma emulsão óleo em água (O/A). A agitação precisa ser alta ($\cong 10.000$ a 25.000 rpm) para obtenção de partículas com diâmetro sub-micrométrico e com baixo PDI. A alta agitação pode ser obtida utilizando um agitador do tipo Ultra-turrax®. Neste equipamento, o eixo externo cisalha a dispersão através da alta rotação da hélice interna produzindo um fluxo turbulento que gera a ruptura das partículas (BELOQUI et al., 2016).

Nos últimos processos, a pré-emulsão obtida é sonicada. A nanoemulsão obtida (O/A) é forçada a passar através de uma membrana de 0,45 μm (ultrafiltração) para remover as impurezas geradas durante a ultrasonicação. Esta técnica é simples, fácil de manusear e eficaz para produzir nanopartículas lipídicas sem solventes orgânicos, mas também tem a limitação de uma etapa extra de filtração da emulsão formada, a fim de remover materiais de impureza (por exemplo, metal) produzidos durante a ultrasonicação e é frequentemente comprometida pela presença de micropartículas (PARHI; SURESH, 2012)

2.4.4.4 Secagem por aspersão

Nanopartículas lipídicas podem ser produzidas pelo processo de secagem por aspersão (*spray-drying*) que consiste na dissolução do lipídeo e do ativo em um solvente orgânico como, por exemplo, clorofórmio. Em seguida, a solução é aspergida em um aparelho (*spray-drier*), no qual um fluxo contínuo de ar quente evapora rapidamente o solvente das gotas aspergidas obtendo partículas secas. Para evitar a agregação das partículas e para aumentar a propriedade de fluxo do produto pulverizado, utiliza-se, por exemplo, lecitina juntamente com o lipídeo. A rápida evaporação do solvente pode influenciar e modificar a estrutura cristalina das substâncias. Por este motivo foi desenvolvido o congelamento por aspersão (*spray-congealing*) que consiste em aspergir o lipídeo fundido no *spray-drier* à temperatura ambiente, solidificando e formando as nanopartículas lipídicas. O uso de diferentes velocidades de resfriamento pode ocasionar a cristalização do lipídeo em diferentes formas polimórficas (BELOQUI et al., 2016; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

2.4.4.5 Microfluidização

A microfluidização é outra tecnologia relatada em diversos estudos. Ela utiliza alta pressão para orientar o fluxo de uma pré-emulsão para uma área de choque. A área/câmara de choque/interação consiste em um sistema de canais em um bloco de cerâmica que divide a pré-mistura em dois fluxos, que são a seguir recombinados, ocorrendo cavitação juntamente com cisalhamento e impacto, o que provoca redução do tamanho de gotícula da emulsão. A eficiência de emulsificação por este método é determinada pelo desenho dos microcanais dentro da câmara de interação; pela pressão liberada, e pelo tempo de processamento (número de ciclos de passagem pela câmara) (CHEN et al., 2013; SINGH et al., 2017).

A câmara de interação do microfluidizador possui um formato de Y ou Z, onde o fluxo do produto pressurizado entra nesta cavidade e passa através de microcanais (cada um com aproximadamente 75 μm de diâmetro) geometricamente fixos, fazendo com que ele acelere a velocidades muito altas. É nesta câmara de interação que o fluxo de produto é influenciado por duas forças primárias, que trazem os resultados desejados: cisalhamento - deformação do fluxo do produto, ocorrendo a partir do contato com as paredes do canal em alta velocidade; impacto – colisão, ocorrendo quando o fluxo de produto de alta velocidade colide sobre si mesmo (CHEN et al., 2013; KENTISH et al., 2008; LEE et al., 2014).

A região do impacto ou câmara de interação é caracterizada por sua rápida dissipação de energia cinética turbulenta. A quebra de gotículas ocorre durante a dissipação de energia dos jatos que entram criando forças de alto cisalhamento para deformação e quebra de gotículas (SINGH et al., 2017).

Lee e Norton (2013) investigaram a gotícula de separação em um microfluidizador e um HAP para a produção de nanoemulsões O/A. Os pesquisadores mostraram que o microfluidizador produziu tamanhos de gotículas semelhantes ao HAP, no entanto, o HAP exigiu várias passagens para atingir o tamanho final das gotas. Então, foi sugerido pelos autores que o jato forçado no microfluidizador cria grandes tensões de cisalhamento dentro da região de impacto altamente turbulenta, criando deformação e quebra de gotículas na primeira passagem.

Outra vantagem do microfluidizador é a presença de fluxo elongacional (aquele no qual o material sofre uma aceleração na direção do fluxo) subsequente ao impacto, o que aumenta o tempo de adsorção do emulsionante e as distribuições de tamanhos de gotículas produzidas (redução do PDI), demonstrando com isso evidências mínimas de coalescência e, consequentemente, aumento da estabilidade, enquanto que a geometria do HAP pode causar desestabilização das gotículas por coalescência (LEE et al., 2014).

De forma semelhante à HAP, quanto maior o número de ciclos aos quais a emulsão é submetida, maior será a redução do tamanho de gotícula, até um determinado limite onde o excesso de energia oferecida ocasiona coalescência das gotículas. Além disso, o aumento da pressão de operação do equipamento, assim como um aumento de temperatura, proveniente da energia dissipada na forma de calor, que pode ser observado durante da microfluidização, também levam a uma redução no tamanho de gotícula da emulsão (MUCHOW; MAINCENT; MÜLLER, 2008).

A maior vantagem deste processo altamente escalável é a contaminação zero do material de alimentação, uma vez que a redução é efetuada pelo próprio material de origem. Muito

embora a microfluidização seja uma técnica adequada para a obtenção de emulsões monodispersas de tamanho nanométrico, há algumas desvantagens em seu uso, como dificuldades para operação, limpeza (é difícil detectar quando a câmara de interação está contaminada ou deteriorada) e escalonamento (devido ao alto custo do equipamento) (SINGH, et al., 2017).

Uma das tendências do mercado cosmético e dermatológico é o desenvolvimento de produtos com o maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira (FRANQUILINO, 2006).

A incorporação de ativos naturais em produtos de uso tópico tem sido uma prática corrente, pois há grande interesse tanto do mercado nacional quanto do internacional, principalmente se a matéria-prima apresenta estudos científicos comprovando a segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (FRANQUILINO, 2006).

Os compostos naturais são amplamente reconhecidos pela sua grande diversidade estrutural, bem como pela sua vasta gama de atividades farmacêuticas. Cabe destacar também que o consumidor está cada vez mais crítico e exigente, optando pelo uso de dermocosméticos que sejam de origem natural, com qualidade cientificamente comprovada.

Neste contexto, a busca por novas fontes de moléculas farmacologicamente ativas ou produtos oriundos dos recursos naturais têm crescido ao longo dos anos, levando o governo brasileiro destacar a *Carapa guianensis* Aublet como uma de suas espécies prioritárias para o desenvolvimento sustentável, assim também sendo recomendado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento com potencial farmacêutico (HAMMER; JOHNS, 1993; KLIMAS; KAINER; DE OLIVEIRA, 2012).

2.5 *Carapa guianensis* Aublet – ANDIROBA

O termo andiroba provem da língua indígena (“*landi*”=óleo e “*rob*”=amargo) e denominam as árvores do gênero *Carapa* que é composto por duas espécies, *C. procera* e *C. guianensis*, que pertencem à mesma família que o mogno (*Meliaceae*) (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2003). A primeira espécie ocorre na África e América do Sul (Guiana Francesa, Suriname e Brasil), enquanto que a segunda, *C. guianensis* ocorre da América Central até o norte da América do Sul (Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil) (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Popularmente esta árvore é conhecida como andiroba, andirobinha, andiroba branca, andiroba-do-iguapó, carape, jandiroba, penaiba (Brasil), roba-mahogany (Estados Unidos); karapa, british-guiana-mahogany (Guiana), bois-caille, carape-blanc, carape-rouge, andiroba-carapa (Guiana Francesa), crabwood (Inglaterra); cedro-bateo (Panamá), andiroba (Paraguai e Peru), krappa (Suriname) (FISCH; FERRAZ; RODRIGUES, 1995).

A espécie *Carapa guianensis* Aublet é uma árvore pertencente à família meliácea e apresenta extensa faixa de disposição geográfica, sendo uma espécie de origem nativa no Brasil, amplamente utilizada na medicina popular e em outros países que abrangem a floresta amazônica (PENIDO et al., 2005).

Carapa guianensis Aublet encontra-se distribuída na América Central até o Norte da América do Sul, como Guiana Britânica e Francesa, Trinidad ao longo da costa do Caribe, Venezuela, Equador, Colômbia, Peru, Suriname, Paraguai e Brasil; Oeste da Índia e Sul da África. No Brasil, sua distribuição geográfica situa-se em toda a bacia amazônica, nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá e Pará) e Nordeste (Maranhão), preferencialmente nas várzeas e áreas alagáveis ao longo dos igapós (HENRIQUES; PENIDO, 2014).

A árvore de *C. guianensis* (figura 16) é de grande porte, possui uma copa de tamanho médio, densa e composta por ramos eretos ou com uma leve curvatura, proporcionando uma sombra intensa (HAMMER; JOHNS, 1993; HENRIQUES; PENIDO, 2014).

Figura 16 - Ilustração da árvore de *C. guianensis*.



Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Andirobaamazonica.jpg>.

A casca da árvore de andiroba é grossa e amarga e apresenta uma coloração avermelhada, mas pode ser também acinzentada. A casca se desprende facilmente em grandes placas. *C. guianensis* é uma árvore perene ou caducifólia e pode atingir até 55 metros de altura, comumente atinge 25-35 metros, apresenta flores com odor e sabor característicos e possui múltiplos usos, sendo a madeira valiosa na fabricação de móveis, na construção civil, em lâminas e compensados (HAMMER; JOHNS, 1993; HENRIQUES; PENIDO, 2014).

A castanha da árvore da andiroba (figura 17) contém cerca de 4 a 12 sementes de coloração marrom com alto teor de óleo amarelo pálido, que as comunidades indígenas extraem para usarem como repelente de insetos e como remédio para vários problemas de saúde. O óleo extraído das suas sementes é considerado um dos mais importantes materiais vegetais medicinais utilizados pelos povos indígenas e moradores tradicionais da região amazônica (MENDONÇA; FERRAZ, 2007). A planta inicia a frutificação 10 anos após o plantio, durante os meses de março a abril. Uma árvore de andiroba é capaz de produzir de 180 a 200 kg/ano de sementes que contem aproximadamente 60% de óleo em massa (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Figura 17 - Fruto da árvore de *C. guianensis* de onde se extrai o óleo das sementes.

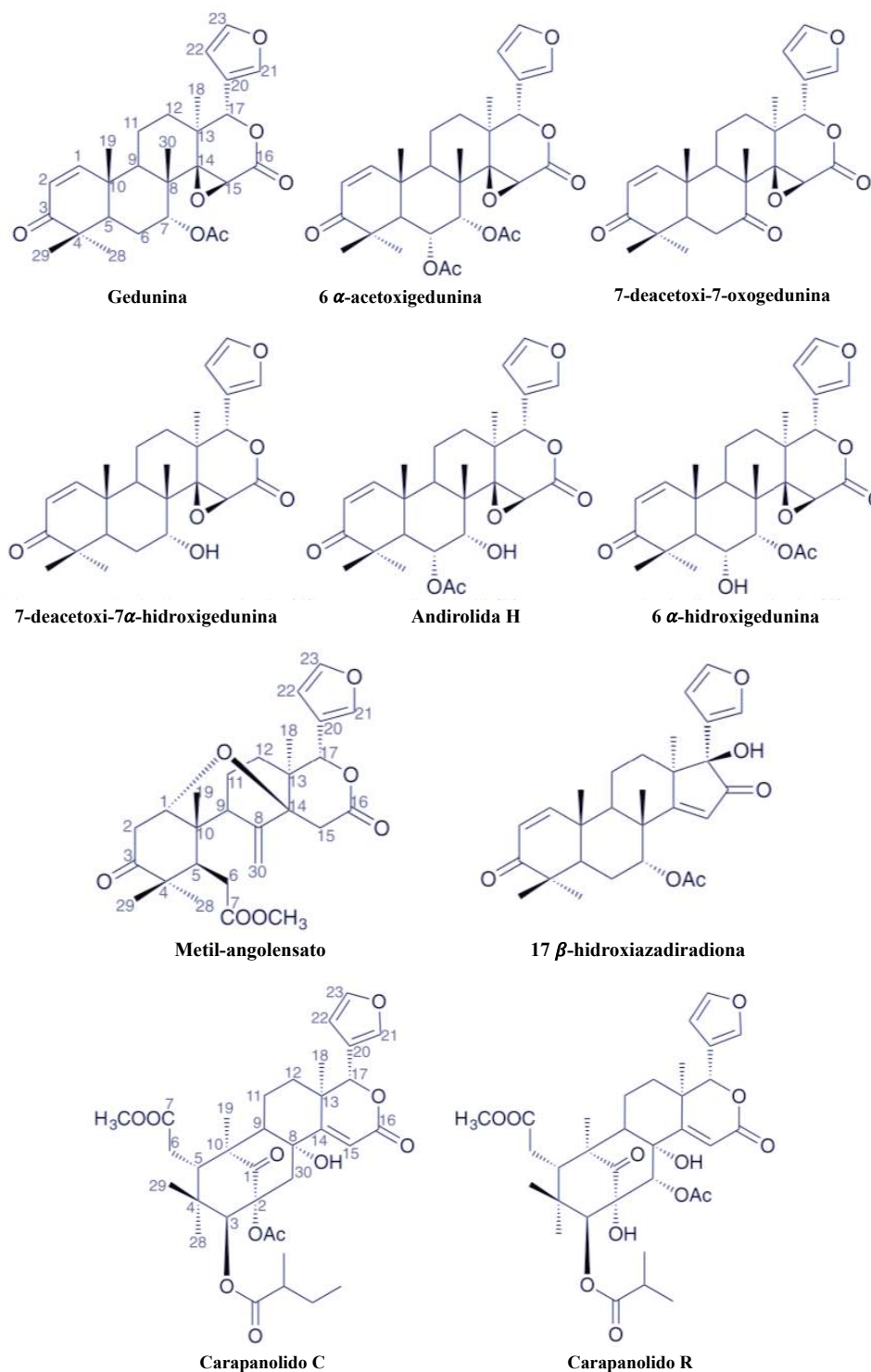


Fonte: FERRAZ et al., 2003.

As sementes da *Carapa* são muito oleaginosas e o óleo é de grande interesse na área farmacêutica e cosmética, sendo empregado no tratamento de várias dermatoses, fabricação de sabonetes e velas. A espécie *Carapa guianensis* Aublet é utilizada por algumas populações juntamente com a espécie *Carapa procera* D. C. no processo de obtenção do óleo de suas

sementes (TAPPIN et al., 2008). O óleo de andiroba (OA) é rico em ácidos graxos como ácido oleico (cerca de 52%), palmítico (cerca de 28%), esteárico e linoleico, e 2-5% do óleo é constituída por limonoides (figura 18) (AMBROZIN et al., 2006; CABRAL et al., 2013; MORIKAWA et al., 2018).

Figura 18 - Limonoides constituintes do óleo de andiroba.



Fonte: Adaptado de Morikawa et al., 2018.

Todas as partes da árvore de *C. guianensis* um grupo químico chamado limonoides ou tetranortriperpenoides, que são os metabólitos secundários, em particular, eles caracterizam membros da família Meliaceae (AMBROZIN et al., 2006; MORIKAWA et al., 2018).

Os componentes químicos de sementes e madeira de *C. guianensis* têm sido extensivamente estudados ao longo dos anos, sendo os limonoides as substâncias com comprovada ação fago repelente, sendo, portanto, as prováveis responsáveis pelas ações repelente e farmacológica. Além disso, diversos componentes da *Carapa guianensis* foram isolados como terpenoides, esteroides, cumarinas, flavonoides e glicerídeos (AMBROZIN et al., 2006; MORIKAWA et al., 2018).

O óleo que é extraído das sementes possui cor amarelo-claro (figura 19), solidifica em temperaturas inferiores a 25°C com consistência parecida com a da vaselina, tem sabor amargo, e rancifica rapidamente após extração das sementes (MENDONÇA; FERRAZ, 2007). A extração do óleo pode ser realizada por 2 métodos distintos (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2003; MENDONÇA; FERRAZ, 2007): Método artesanal, cujo rendimento é estimado em 4%; e método industrial, rendimento estimado em 8%.

Figura 19 - Óleo cru das sementes de andiroba.



Fonte: Próprio autor.

O OA tem apresentado grande interesse pelas indústrias farmacêutica e cosmética. Dentre suas propriedades destacam-se a ação anti-inflamatória (PENIDO et al., 2006), repelente

de inseto, efeito larvicida (MIOT et al., 2004, 2011; MENDONÇA et al., 2005) e também foram descritas as ações antialérgica e analgésica (PENIDO et al., 2005). Os usos terapêuticos como produto tópico e a fonte natural do OA, assim como a segurança toxicológica permitem vários estudos tecnológicos.

Devido à grande quantidade de ácidos graxos, esse óleo pode sofrer facilmente reações de oxidação, resultando em produtos alergênicos e/ou produtos com menor atividade biológica (CABRAL et al., 2013). A nanoencapsulação desses óleos em sistemas de liberação de fármacos tem sido proposta devido à capacidade de melhorar a solubilidade, estabilidade e eficácia de formulações baseadas nesses compostos.

Baldisseia e colaboradores investigaram a susceptibilidade *in vitro* do *Trypanosoma evansi* aos óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) e Aroeira (*Schinus molle*), na sua forma convencional e na forma de NE. Seus resultados indicaram que os óleos nas duas formas (convencional e nanoemulsionado) tiveram alta atividade contra o *T. evansi in vitro*, sugerindo que esses óleos podem ser utilizados como uma alternativa para tratamento contra esse parasita (BALDISSERA et al., 2013).

Devido a já conhecida atividade inseticida e propriedades medicinais do OA, Senhorini e colaboradores desenvolveram e caracterizaram com sucesso micropartículas poliméricas por emulsificação com evaporação do solvente, encapsulando o óleo de interesse (SENHORINI et al., 2012).

MilhOMEM-PAIXÃO e colaboradores avaliaram um estudo comparativo de citotoxicidade, genotoxicidade e hematoxicidade do OA e sua nanoemulsão. Foi observado *in vitro* que quando maiores as concentrações do OA e nanoemulsão maior era a morte celular e a nanoemulsão demonstrou ser menos citotóxico que OA. Citotoxicidade, genotoxicidade e hematotoxicidade não foram observadas *in vivo* (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017).

É de grande importância aumentar o conhecimento sobre os efeitos adversos e/ou protetores dos produtos naturais, como o OA. Além dos já reconhecidos efeitos farmacológicos do OA, assim como ausência de toxicidade, Melo e colaboradores (2018), em mais recente trabalho, determinaram o potencial genotóxico e antigenotóxico do OA. Além disso, testaram uma nanoemulsão produzida com OA e compararam os efeitos. Os autores usaram o teste do cometa e o teste do micronúcleo. Os resultados não mostraram citotoxicidade ou genotoxicidade nos camundongos tratados tanto com o AO quanto com a NE. No entanto, houve uma redução significativa nos números de eritrócitos policromáticos em todos os grupos tratados com doxorrubicina, incluindo aqueles pré-tratados com OA e nanoemulsão. Assim, as amostras testadas não protegeram contra a doxorrubicina. Por outro lado, os resultados

mostraram um grande aumento na formação de micronúcleos quando os camundongos foram tratados apenas com doxorubicina; estes números foram reduzidos quando os animais foram pré-tratados com OA e nanoemulsão. Os resultados indicam um efeito protetor do OA na formação de micronúcleos e não mostram evidências de genotoxicidade em camundongos (MELO et al., 2018).

2.6 HIDROGÉIS COMO VEÍCULO PARA NANOSSISTEMAS

Veículos semissólidos são caracterizados como materiais que retenha sua forma quando não estiverem confinados, mas flua ou deforme quando for aplicada uma força externa (SOUTO et al., 2004). São utilizados com o intuito de atingir viscosidade desejável e textura para aplicação tópica. Dentre os veículos utilizados para aplicação de ativos hidrofóbicos, os hidrogéis aparecem como os mais interessantes, uma vez que veículos oleosos, como as pomadas, há alta afinidade entre o fármaco e a base de formulação comprometendo uma transferência de fármaco eficiente para a pele (GABRIEL et al., 2016).

Por definição, os hidrogéis são redes poliméricas com configuração tridimensional capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Sua capacidade e afinidade em absorver água é atribuída à presença de grupos hidrofílicos como -OH, -CONH-, -CONH₂- e -SO₃H na molécula dos polímeros, formando estruturas de hidrogel. Devido à contribuição destes grupos e domínios nas redes hidrofílicas tridimensionais reticuladas, os polímeros exibem boas propriedades de intumescimento capazes de reter grandes volumes de água (tipicamente de 30 a 90% em peso), dependendo da natureza do ambiente aquoso e da composição do polímero. A estrutura altamente porosa dessas redes de hidrogel facilita o encapsulação de várias moléculas bioativas e estão sendo amplamente explorados em sistemas de liberação de fármacos (HOARE; KOHANE, 2008; KULKARNI et al., 2015; NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

As propriedades físicas únicas dos hidrogéis geram particular interesse em sistemas de liberação de fármacos. Sua estrutura altamente porosa pode ser facilmente ajustada controlando-se a densidade de ligações cruzadas na matriz do gel e a afinidade dos hidrogéis pelo meio aquoso em que estão intumescidos. Sua porosidade também permite o aprisionamento de ativos na matriz do gel e a liberação subsequente do fármaco a uma taxa dependente do coeficiente de difusão da molécula (pequena ou macromolécula) através da sua rede tridimensional (KULKARNI et al., 2015; NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

Os benefícios dos hidrogéis para a liberação de fármacos podem ser em grande parte farmacocinéticos e especificamente porque uma formulação de depósito é criada a partir da qual os fármacos lentamente eluem, mantendo uma alta concentração local de princípio ativo nos tecidos circunvizinhos durante um período prolongado, embora também possam ser usado para entrega sistêmica (HOARE; KOHANE, 2008; NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

Os biohidrogéis são capazes também de proteger o seu conteúdo (fármacos, nanossistemas) de ambientes hostis, além disso, os hidrogéis podem regular a liberação do fármaco, modificando a estrutura do gel em resposta a um estímulo específico, como temperatura, pH e força iônica (CHAI; JIAO; YU, 2017; NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019). Os hidrogéis também são geralmente altamente atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, promovido pelo alto teor de água e a similaridade físico-química com a matriz extracelular, tanto composicionalmente (particularmente no caso de hidrogéis à base de carboidratos) quanto mecanicamente (KULKARNI et al., 2015).

A biodegradabilidade ou dissolução dos hidrogéis como sistema de liberação de fármacos no local desejado pode ser desenvolvida via caminhos enzimático, hidrolítico ou ambiental (por exemplo, pH, temperatura, ou campo elétrico). No entanto, a degradação nem sempre é desejável, dependendo da escala de tempo e da localização do dispositivo de entrega do fármaco (NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019). Os hidrogéis também são relativamente deformáveis e podem se adaptar à forma da superfície à qual são aplicados. Neste último contexto, as propriedades muco ou bio-adesivas de alguns hidrogéis podem ser vantajosas em imobilizá-las no local de aplicação ou em aplicá-las em superfícies que não são horizontais (HOARE; KOHANE, 2008).

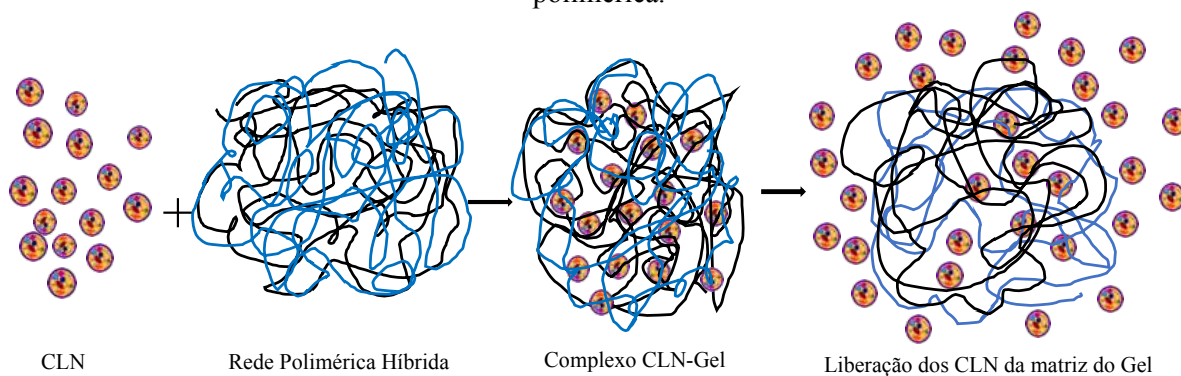
Desenvolver formulações adequadas compostas de nanopartículas lipídicas para administração tópica, dérmica e transdérmica, normalmente é necessário um veículo semissólido para dispersar as formulações de sistemas coloidais (DESFRANÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018; DOKTOROVOVA; SOUTO, 2009).

Em recente trabalho, Jain et al., (2019) desenvolveram, otimizaram e caracterizaram nanoformulações baseadas em lipídeos (NPLC, NLS, CLN e Lipossomas) com o Tac encapsulado e veiculadas em gel de Carbopol® ultrez 10 NF para uso na psoríase. Os autores evidenciaram um aumento significativo da viscosidade dos nanossistemas, permitindo a retenção das formulações na pele por mais tempo, concluindo que a matriz de gel também assegura a liberação sustentada do Tac, podendo ajudar a reduzir os efeitos tóxicos e manter o gradiente de concentração do fármaco na pele.

As atrativas propriedades físicas dos hidrogéis, especialmente a sua porosidade, oferecem enormes vantagens em aplicações na distribuição de fármacos, tais como a libertação sustentada de ativos encapsulados em nanosistemas. Uma concentração local elevada do fármaco pode ser retido durante um longo período de tempo e, através de um mecanismo de libertação adequado, controlado por difusão, intumescimento, químico ou com base em alguns estímulos ambientais, o fármaco é liberado, possibilitando controlar com precisão a sua cinética de libertação, espacial e temporalmente, o que tornam esses sistemas híbridos versáteis, sintonizáveis e adequados para uma ampla gama de aplicações (NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

Os sistemas semissólidos baseado em hidrogel compreendem um veículo onde o nanossistema contendo um fármaco é disperso e retido na rede polimérica, podendo ser vantajosamente combinados para fornecer uma estratégia de dupla encapsulação para a libertação controlada de fármacos lipofílicos (DESFRANÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018). Os fármacos lipofílicos podem ser eficientemente encapsulados em nanopartículas lipídicas para as quais o núcleo lipídico proporciona uma matriz adequada, sendo a própria nanopartícula encapsulada no interior do suporte do hidrogel (figura 20).

Figura 20 - Combinação do hidrogel híbrido com nanopartícula lipídica e sua libertação da matriz polimérica.



Fonte: Adaptado de Dannert; Stokke; Dias, 2019 e Harrison; Spada, 2018.

De acordo com Desfrançois e colaboradores (2018), nos últimos vinte anos, diferentes tipos de polímeros foram desenvolvidos para criar estruturas de hidrogel, de polímeros sintéticos a polissacarídeos naturais, todos eles exibem propriedades úteis. Os autores relatam que a grande maioria dos sistemas de administração de fármacos a base de hidrogel e nanopartículas utiliza formulações baratas, comercialmente disponíveis e prontas para uso, como é o caso do ácidos poli (acrílicos) (comumente denominados Carbopol®), representando

26% dos trabalhos revisados quando associados à nanopartículas lipídicas. O segundo material mais empregado para construção de sistemas de aprisionamento de nanopartículas lipídicas são os polissacarídeos (24% de ocorrência), pelas suas propriedades biológicas, especialmente sua alta biocompatibilidade.

Dentre estes biopolímeros, os três polissacarídeos mais utilizados em combinação com nanopartículas lipídicas podem ser destacados: quitosana (27% de ocorrência), celulose (23%), xantana (27%), dextrano (10%) e alginato (10%) (DESFRAÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018). Além disso, esses polissacarídeos podem ser combinados para melhorar as características físico-químicas dos hidrogéis, como é o caso do sistema híbrido a base de hidroxiethylcelulose (HEC) e o biopolímero obtido da fermentação da cana-de-açúcar (ZBP), que é uma dispersão polimérica obtida por hidratação da celulose microcristalina bacteriana da espécie *Zoogloea* sp na proporção de 0,8% de celulose em 99,2% de água e esterilizado por raios gama (COELHO JUNIOR et al., 2015).

A celulose bacteriana ou simplesmente biopolímero de cana, um subproduto do processo de produção da cana-de-açúcar, é um exopolissacarídeo natural obtido pela ação de bactérias da espécie *Zoogloea* sp cultivada em melaço; sua estrutura química consiste em açúcares polimerizados estáveis obtido por flotação na forma de uma matriz gelatinosa, composta por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%. Devido a sua composição química e propriedades físicas, o ZBP é um biomaterial promissor para muitos usos médicos e biológicos (ALBUQUERQUE et al., 2011; PINTO et al., 2016).

Diante do contexto apresentado, verifica-se que CLN melhoram a eficiência de encapsulação de fármacos e minimizam a expulsão de princípios ativos ao longo do tempo de armazenagem. Esse sistema é vantajoso para aplicação tópica, porque formam filmes oclusivos, existe um perfil de liberação controlada e a formulação é biodegradável e relativamente não tóxica. Além disso, o pequeno tamanho das duas partículas garante o contato com o estrato córneo, facilitando o aumento da penetração do fármaco na pele.

Verifica-se também que a forma farmacêutica comercial do tacrolimus, constitui na sua fórmula hidrocarbonetos derivados do petróleo, de composição bastante complexa, como o petrolato branco, petrolato líquido, cera branca e parafina sólida, e ainda o solvente orgânico carbonato de propileno. Essas substâncias apresentam um certo grau de toxicidade cutânea, aumentando o risco de dermatites, além de um impacto ambiental considerável, pois são obtidos de fontes não-renováveis e não são biodegradáveis. Considera-se também a textura e o sensorial

da pomada que é um tanto desagradável quando aplicada sobre a pele. Ademais, a pomada de tacrolimus apresenta reações adversas como sensação de queimação, ardência, dor ou prurido na pele, e suscetibilidade às infecções superficiais da pele, como pode estar associado a um risco aumentado de infecção pelo vírus varicela zoster (varicela ou cascalho), infecção pelo vírus herpes simplex ou eczema herpético (MALECIC; YOUNG, 2016). Essas características da apresentação comercial do tacrolimus representam um problema para a não adesão dos pacientes ao tratamento.

Novos desafios no desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos baseados em nanotecnologia incluem: a viabilidade de processos de expansão que trazem rapidamente técnicas terapêuticas inovadoras ao mercado e a possibilidade de obter sistemas multifuncionais para atender a vários requisitos biológicos e terapêuticos, que incluem investigar a eficiência de direcionamento de nanopartículas e satisfazer os padrões internacionais por sua toxicologia e biocompatibilidade (TAPADIYA; KALE; SABOO, 2017).

Hoje, uma das tendências do mercado farmacêutico, cosmético e alimentício é o desenvolvimento de produtos com o maior número de componentes de origem natural, principalmente os de origem vegetal, explorando racionalmente a biodiversidade brasileira (AMARAL; FIERRO, 2013).

O Brasil é o país com a maior diversidade de plantas do planeta, considerada megabiodiversidade, e quase 13% dos estimados 1,9 milhão de espécies de plantas conhecidas hoje são encontradas no Brasil. A Amazônia representa 7% da superfície do planeta e abriga cerca de 50% da biodiversidade global, com mais de 55.000 espécies de plantas, o que equivale a 22% de todas as espécies já catalogadas em todo o mundo (AMARAL; FIERRO, 2013).

O interesse nos usos tradicionais de plantas e seus produtos no Brasil tem aumentado gradualmente nos últimos anos, resultando em um conjunto significativo de publicações nessa área. No entanto, há pouco incentivo das instituições para promover a conversão dos resultados da pesquisa em patentes e em produtos, o que pode levar a uma perda de oportunidades para a exploração comercial e econômica da biodiversidade (BRANDÃO et al., 2008).

Em vista do crescente interesse e do potencial uso de plantas medicinais, incluindo a andiroba, juntamente com o grande número de informações sobre novas tecnologias que podem ser encontradas e utilizadas no desenvolvimento de novos produtos, a estratégia de aplicação da nanotecnologia em extratos vegetais tem sido amplamente citada na literatura, porque os sistemas nanoestruturados podem potencializar a ação dos extratos vegetais, promover a liberação sustentada de constituintes ativos, reduzir a dose necessária, diminuir os efeitos colaterais e melhorar a atividade de fármacos que apresentam problemas físico-químicos,

farmacológicos e de toxicidade, como é o caso do tacrolimus (TAPADIYA; KALE; SABOO, 2017).

O óleo de andiroba, assim como outras plantas medicinais, está incluída na Lista de Plantas Medicinais de Interesse do Ministério da Saúde, é um dos produtos mais vendidos na Amazônia, com demanda internacional, sendo exportado para a Europa e para os Estados Unidos. No entanto, não existem grandes áreas de cultivo e a extração de óleo é feita por pequenos grupos de famílias que colhem os frutos, contribuindo para a sustentabilidade local (AMARAL; FIERRO, 2013; BRANDÃO et al., 2008).

Os CLN de óleo de andiroba contendo Tac e veiculado em um biohidrogel representa um sistema interessante para a terapia da psoríase, devido às suas características positivas como sistemas de liberação: mais recente geração de nanopartículas lipídicas, demonstração de propriedades aprimoradas como ajuste do perfil de liberação, eficiência de encapsulação, estabilidade, biocompatibilidade e eficácia na entrega e proteção do fármaco, especialmente os lipofílicos; aumento da retenção e penetração cutânea, por causar oclusão do estrato córneo, além de reduzir efeitos colaterais relacionados.

Ademais, este sistema de liberação pode aumentar a solubilidade do Tac, sua internalização em células epidérmicas e sua eficácia farmacológica com o mínimo de efeitos tóxicos, associado à composição do OA, que pode melhorar as ações terapêuticas do fármaco e diminuição dos efeitos adversos. Arelado a isso, existe ainda a veiculação das nanopartículas em um biohidrogel que representa uma apresentação farmacêutica com um sensorial mais aceitável e possibilita a formação de um filme polimérico na superfície cutânea, aumentando a retenção dos CLN na pele e a hidratação do estrato córneo, contribuindo para penetração do tacrolimus até as células-alvo que estão envolvidas nos mecanismos da fisiopatologia da psoríase.

Cabe ressaltar que até o presente momento não há na literatura estudos sobre a utilização de CLN com OA, que além de funcionar como um constituinte do nanossistema na formação das nanoestruturas, como fase oleosa para solubilizar o fármaco, pode atuar como um bioativo na terapia da psoríase. A incorporação dos nanocarreadores contendo tacrolimus ao biohidrogel como veículo para uso tópico, pode otimizar o perfil de liberação, permeação/penetração e retenção cutânea, além da potencialização das ações farmacológicas do tacrolimus e do óleo de andiroba, o que configura o caráter inovador do presente trabalho, contribuindo para o desenvolvimento de habilidades tecnológicas e oportunidades de trabalho e exploração comercial da área.

3 OBJETIVOS

A seguir, os objetivos gerais e específicos que nortearam o desenvolvimento desta tese.

3.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema inovador na forma de carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) contendo tacrolimus (Tac-CLN) veiculados em biohidrogel (Tac-CLN/ZBP-HEC), visando uma futura avaliação da eficácia no tratamento da psoríase.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados a base do óleo de andiroba contendo tacrolimus, através do estudo de pré-formulação e otimização pelo planejamento experimental Box-Behnken;
- Avaliar a estabilidade preliminar e acelerada dos CLN e dos CLN veiculados no biohidrogel ZBP-HEC;
- Caracterizar Tac-CLN quanto ao tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação do fármaco, cristalinidade, estabilidade e morfologia;
- Analisar a penetração e/ou permeação cutânea, assim como quantificar a distribuição do tacrolimus nas camadas da pele de orelha de porco contido nas formulações de CLN, no biohidrogel e nos CLN veiculados no biohidrogel, utilizando células de Franz e a técnica de *tape stripping*.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Os itens a seguir apresentarão os materiais, equipamentos e reagentes que foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho, assim como as suas metodologias.

4.1 MATERIAIS

Diestearato de glicerila (Precirol® ATO5; Gattefossé, Saint-Priest, França); Óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet; Amazon Oil, Pará, Brasil); Polioxietileno (80) monoleato de sorbitano (Polisorbato 80, Tween® 80; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Lecitina da gema do ovo com 80% de fosfatidilcolina (Lipoid® E80; Lipid®, Ribeirão Preto, Brasil); Fosfatidilcolina de soja (Lipoid® S100; Lipid®, Ribeirão Preto, Brasil); Orelha de porco (matadouro de Paulista, Pernambuco, Brasil); BF₃-MeOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Água ultrapurificada (Mili-Q® A-10; Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha); Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Hidroxietilcelulose (Natrosol®, Pharmanostra, São Paulo Brasil), Gel do biopolímero da cana-de-Açúcar (Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, Brasil); Tacrolimus monohidratado (Pharmanostra, lote n. 170101, val. 18/01/2021, São Paulo, Brasil); Polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic® F68, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Acetato de etila (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Fita adesiva Scotch-Brite® 3M (Sumaré, São Paulo, Brasil); Fita adesiva dupla face de carbono (Hatfield, Pensilvânia, Estados Unidos); Dodecil sulfato de sódio (GE healthcare, Bélgica); Filtros (Millex® de 0,22 µm, Merck Milipore, Alemanha); Metilparabeno e Propilparabeno (Nipagin® e Nipasol®; Fagron, São Paulo, Brasil); Propilenoglicol (Synth, São Paulo, Brasil); Etanol (Synth, São Paulo, Brasil); Balões volumétricos; Vials; Espátulas de metal; Balança de precisão; Banho de Ultrassom; Pipetas automáticas; Pinça cirúrgica; Bisturi e suporte;

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA

Os ácidos graxos livres do óleo cru das sementes de andiroba foram tipificados e quantificados via hidrólise dos tiacilglicerídeos, previamente derivatizados por metilação

usando trifluoreto de boro (BF_3) em metanol, e posteriormente analisados por cromatografia gasosa com detector de massas (CG-EM).

4.2.1 Derivatização do óleo de andiroba

Para reação de derivatização por esterificação dos ácidos graxos através da metilação do OA, cerca de 50 mg do óleo cru das amêndoas de andiroba foram pesados em *vial* de vidro e 1,5 mL de metanol foi adicionado. O tubo foi fechado e agitado vigorosamente em vórtex. Logo após a agitação, 200 μL de $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ foram adicionados e a solução foi levada ao banho-maria a 60°C por 60 min. Após a reação, esperou-se o excesso de metanol evaporar sob fluxo de ar, em capela de exaustão, e 1,0 mL de acetato de etila foi adicionado e agitado em vórtex. Em seguida, 10 μL da mistura anterior foram adicionados em *vial* com 1,0 mL de acetato de etila. Após diluição, a mistura foi levada imediatamente para análise no CG-EM.

4.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Após derivatização do óleo bruto das amêndoas de andiroba, usando o $\text{BF}_3\text{-MeOH}$, a identificação e quantificação dos constituintes foram realizadas no cromatógrafo a gás de alta resolução acoplado com um sistema de detecção por espectrometria de massas (CG-EM). O cromatógrafo a gás, Trace® 1300 Mainframe (Waltham, Massachusetts, EUA), foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Agilent® J&W DB-5ms Ultra Inert (Agilent® J&W Technologies, Santa Clara, EUA) medindo 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura do filme. O CG-EM foi equipado com um detector seletivo de espectrometria de massa ISQ® QD quadrupolo simples (Waters, Milford Massachusetts, USA), operado a 70 eV e a ionização foi realizada por impacto eletrônico (IE).

O forno do CG-EM foi operado a uma temperatura inicial de 110°C até 260°C com uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, o tempo final de espera foi de 26 min a 280°C , utilizando o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi fixada em 250°C e 1,0 μL da amostra foi injetada no CG através de um auto injetor Thermo Scientific® AI/AS-1310 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

O espectrômetro de massa foi operado no modo *scan*, iniciando após 3 min, com faixa de massa de 40-800 u.a.m a 1 *scan* por segundo. A detecção e detalhamento dos compostos presentes na amostra foi obtida por espectrometria de massa, através da relação entre massa/carga dos compostos separados. Os componentes do OA foram identificados pela

comparação dos seus espectros de massa com os do banco de dados da biblioteca de lipídeos do sistema de espectrometria de massa Thermo® Xcalibur®.

A concentração de ácidos graxos livres (AGL) foi determinada pelo cálculo da normalização da área do pico através da equação 1 (MELO et al., 2018). Onde A_i é a área do pico normalizada identificada e ΣA_t é a soma das áreas de todos os picos obtidos. Análises realizadas do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

$$AGL(\%) = \frac{A_i}{\Sigma A_t} \times 100 \quad (1)$$

4.3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE CLN

Os estudos de pré-formulação foram realizados para avaliar as concentrações ideais de lipídeos sólido e líquido, constituintes da matriz dos nanocarreadores, e observar possíveis interações físico-químicas e cristalinidades dos lipídeos.

4.3.1 Efeito da mistura física dos lipídeos

Misturas Binárias (MB) entre o óleo de andiroba (OA) e o diestearato de glicerila (Pre) em diferentes proporções (OA:Pre; 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10) foram preparadas a fim de estudar a melhor interação entre as matrizes lipídicas sólida e líquida.

4.3.1.1 Análise térmica

O analisador termogravimétrico simultâneo TGA/DSC 2 STAR® (Mettler-Toledo®, Suíça) foi utilizado para avaliar as variações das propriedades físicas e os produtos de reação das amostras. O equipamento foi operado a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e faixa de temperatura de 25 a 400°C. O ensaio foi conduzido sob atmosfera de nitrogênio com um fluxo de gás de 50 mL/min. Um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência. O sistema calorimétrico foi calibrado em temperatura de transição e mudanças de entalpia, seguindo o procedimento do equipamento, utilizando índium como padrão. Cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados nos cadinhos de alumínio, fechados hermeticamente e submetidos às análises.

Os dados obtidos de DSC foram tratados a partir das áreas dos picos usando o programa Mettler STAR^e versão 16.0. A cristalinidade ou índice de recristalinização para as MB foi calculado de acordo com a equação 2 (BHADRA et al., 2017; HAN et al., 2008; KALAYCIOGLU; AYDOGAN, 2016): onde o $\Delta H_{\text{Amostra}}$ é a entalpia de fusão da mistura binária (OA:Pre), ΔH_{Bulk} é a entalpia de fusão do lipídeo sólido (Pre). Análises realizadas no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas da UFPE.

$$IC = \frac{\Delta H_{\text{Amostra}}}{\Delta H_{\text{Bulk}}} \times 100 \quad (2)$$

4.3.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para a obtenção dos espectros de FTIR as amostras foram analisadas utilizando o espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier 4600 séries (Jasco, Easton, EUA), equipado com o sistema de reflectância total atenuada (ATR) (ATR-PRO ONE, Jasco, Easton, EUA) com placa de cristal de seleneto de zinco (ZnSe) (7,2 x 1,0 cm²), área de contato de 2,5 mm, ângulo de incidência de 45°. As amostras foram colocadas no dispositivo ATR sem tratamento prévio e 32 varreduras foram realizadas para cada espectro, com resolução de 4 cm⁻¹ e velocidade de varredura de 2 mm/s. Os espectros foram coletados entre 4000 e 600 cm⁻¹ e as análises foram tratadas através do programa Spectra Manager®. Análises realizadas no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas da UFPE.

4.3.2 Efeito dos constituintes da formulação

Diferentes tipos e concentrações de lipídeos e tensoativos foram usados no estudo de pré-formulação dos CLN. Neste estudo, dois lipídeos foram usados: O óleo bruto da amêndoa da andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), como lipídeo líquido, no intervalo de 3 a 10% (ANDRADE et al., 2007; BALDISSERA et al., 2013; COSTA-SILVA et al., 2007, 2008; FERREIRA et al., 2010; HENRIQUES; PENIDO, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; SENHORINI et al., 2012; VAUCHER et al., 2015), e o diestearato de glicerila (Precirol® ATO 5), como o lipídeo sólido, na concentração máxima de 10 %. Os surfactantes hidrofílicos (Pluronic® F68, Tween® 80) e lipofílicos (Lipoid® S100, Lipoid® E80) foram usados a 3%, com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de 12 (FERREIRA et al., 2010; JESUS et al., 2017).

As formulações foram preparadas pela técnica de emulsificação a quente, onde as fases oleosa e aquosa foram pesadas separadamente e aquecidas ($70 \pm 10^\circ\text{C}$) em banho-maria até fusão dos lipídeos. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e a agitação da pré-emulsão (9500 rpm) em dispersor ultra-turrax® T25 (Janke&Kunkel GmbH and Co. KG, Staufen, Alemanha) foi mantida por 3 min. Após tempo previsto de agitação, as formulações foram levadas ao microfluidizador M110P (Microfluidizer®, Microfluidics, Newton, Estados Unidos da América) a pressão de 1000 bar (CHEN et al., 2013; SONG et al., 2014). As formulações que apresentaram aspecto macroscópico ideal como, leitosas, fluidas e homogêneas, foram analisadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer® nano ZS90, Malvern instrumentos, São Paulo, Brasil) através dos parâmetros tamanho e PDI.

4.3.3 Efeito do processo de produção

Temperatura de produção ($70 \pm 10^\circ\text{C}$) e a agitação da pré-emulsão (9500 rpm), foram definidos através de estudos baseados nos trabalhos de Chen et al., (2013) e Song et al., (2014). A formulação selecionada para este estudo foi a que se apresentou mais estável macroscopicamente no estudo do item 4.3.2. O efeito do número de ciclos (1-16) e pressão (100 a 1000 bar) no microfluidizador foram avaliados através dos parâmetros de D e PDI pela técnica de DLS usando o Zetasizer® nano ZS90.

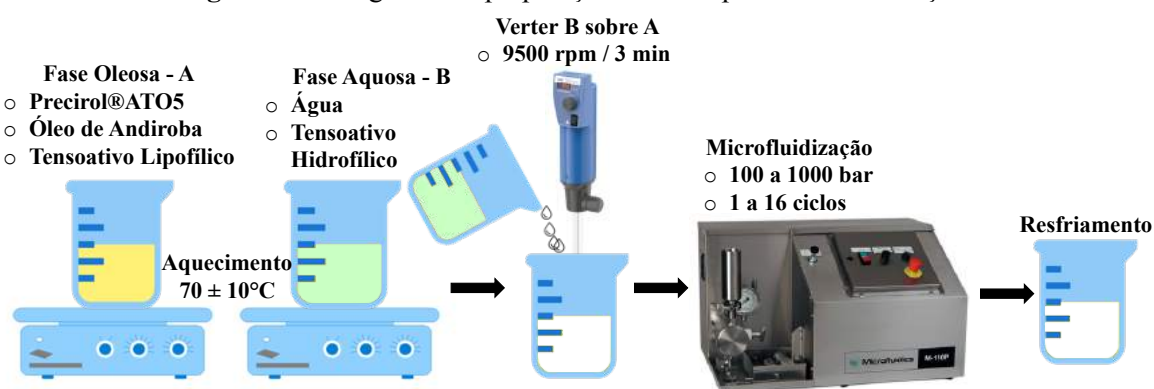
4.4 PREPARAÇÃO DE CLN CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA

Os CLN foram preparados pela técnica de microfluidização com modificações (CHEN et al., 2013). Inicialmente, a fase oleosa contendo 1,5-10 % de Pre, 10 % de OA e 0,3 ou 0,75% de surfactante lipofílico (Lipoid® S100 ou Lipoid® E80) foi pesada em béquer de vidro. A fase aquosa contendo água purificada e 2,03 ou 2,4% de surfactante hidrofílico (Pluronic® F68 ou Tween® 80) foi pesada separadamente em outro béquer. Ambas as fases foram levadas para o banho-maria e aquecidas a $70 \pm 10^\circ\text{C}$ até fusão dos lipídeos.

Posteriormente, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante em dispersor ultra-turrax® T25 a 9500 rpm por 3 min. Em seguida, a emulsão pré-formada foi levada ao microfluidizador equipado com uma câmera de interação F12Y tipo Y de diamante (Microfluidizer®, Microfluidics, Newton, Estados Unidos da América) a pressão de 100 a 1000 bar, por 1-16 ciclos consecutivos. Após passagem pelo microfluidizador, os carreadores

lipídicos pré-formados foram resfriados em temperatura ambiente para promover a recristalização dos lipídeos. A dispersão coloidal obtida foi armazenada a 4°C em frasco de vidro até realização das caracterizações físico-químicas (figura 21) (CHEN et al., 2013; SONG et al., 2014).

Figura 21 - Diagrama da preparação de CLN por microfluidização.



Fonte: Adaptado de Müller et al., 2002.

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CLN

O planejamento experimental do tipo Box-Behnken foi selecionado para otimizar a produção de CLN contendo OA. CLN foram produzidos conforme descrito na sessão 4.4 usando tween® 80 (PS80), lipoid® E80 (LE80), temperatura de produção de 70 ± 10°C, agitação no ultra-turrax® da pré-emulsão de 9500 rpm, pressão de 1000 bar e 5 ciclos no microfluidizador. As concentrações de lipídeo total (LT) (10, 15 e 20%), lipídeo líquido (LL) (20, 40 e 60%) e surfactante (SF) LE80:PS80 (25:75) de 1, 3 e 5%, foram usadas como variável independente. Enquanto que, D, PDI e PZ foram trabalhados como variáveis dependentes (tabela 2).

O objetivo da otimização foi produzir CLN com os menores diâmetros (D) na escala nanométrica, baixo índice de polidispersão (PDI) e elevado potencial zeta (PZ). Assim, 15 experimentos aleatorizados foram realizados (tabela 3).

Os efeitos das variáveis estudadas foram interpretados gráfica e estatisticamente utilizando o programa Statistica® (versão 7.0, StatSoft® Inc., EUA). Gráficos de superfície de resposta foram gerados para visualizar o efeito simultâneo de cada variável em cada parâmetro de resposta.

Tabela 2 - Codificação das variáveis e dos níveis no estudo da metodologia de superfície de resposta do planejamento experimental Box-Behnken.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de OA	20	40	60
Concentração de LT (Pre e OA)	10	15	20
Concentração de SF (25:75)	1	3	5
Variáveis Dependentes	Limites		
D (nm)	Mínimo		
PDI	Mínimo		
PZ (mV)	Máximo		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: OA (óleo de andiroba), LT (lipídeo total), Pre (diestearato de glicerila), SF (surfactantes), D (diâmetro), PDI (índice de polidispersão), PZ (potencial zeta).

Tabela 3 - Formulações aleatorizadas utilizadas para produção de CLN através do planejamento experimental do tipo Box-Behnken.

Formulação	Variáveis Independentes		
	LL	LT	SF
F1	40(0)	20(+1)	5(+1)
F2	20(-1)	20(+1)	3(0)
F3	20(-1)	15(0)	5(+1)
F4	20(-1)	15(0)	1(-1)
F5	60(+1)	10(-1)	3(0)
F6	40(0)	10(-1)	1(-1)
F7	60(+1)	15(0)	5(+1)
F8	40(0)	20(0)	3(0)
F9	40(0)	20(+1)	1(-1)
F10	40(0)	10(-1)	5(+1)
F11	40(0)	15(0)	3(0)
F12	60(+1)	20(+1)	3(0)
F13	40(0)	15(0)	3(0)
F14	60(+1)	15(0)	1(-1)
F15	20(-1)	10(-1)	3(0)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: (-1), (0) e (+1) são os níveis mínimo, central e máximo, respectivamente para as variáveis independentes. LL (Lipídeo Líquido), LT (Lipídeo Total) e SF (Surfactantes).

4.6 FORMULAÇÕES DE CLN

Posteriormente aos estudos de pré-formulação e ao planejamento experimental Box-Behnken, formulações de CLN contendo tacrolimus e a produção do biohidrogel, com posterior veiculação do CLN foram elaboradas de acordo com os tópicos a seguir.

4.6.1 Incorporação de tacrolimus em CLN

A concentração final de Tac para a encapsulação nos CLN foi definida baseando-se nos resultados obtidos nos estudos de solubilidade máxima aparente no óleo de andiroba (30 mg/mL), assim como na dose usual recomendada, que é de 1,0 mg/g para tratamento da psoríase. A quantidade estipulada de tacrolimus para produção dos nanossistemas neste estudo foi estabelecida em 2,0 mg/mL o que corresponde a uma concentração de 0,2% de Tac na formulação total de CLN correspondendo a 100 mL da dispersão (tabela 4).

Tabela 4 - Formulação de CLN de OA contendo 2 mg/mL ou 11,11 mg/g Fonte: (massa anidra) de Tac.

Componentes	Concentração (%)
Fase Oleosa	
OA	9,0
Pre	6,0
LE80	$0,75 \times fc(1,25) = 0,94$
Tac H ₂ O	$0,2 \times fc(1,022) = 0,2044$
Fase Aquosa	
PS80	2,25
Água Purificada (q.s.p)	100,00

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: OA (óleo de andiroba), Pre (diestearato de glicerila), LE80 (Lipoid® E80), Tac H₂O (tacrolimus monohidratado, PS80 (polisorbato 80), fc (fator de correção), q.s.p (quantidade suficiente para).

A dispersão contém um conteúdo lipídico total de 15% (m/v), estabilizado por 3% (m/v) de surfactante (polisorbato 80:lecitina, razão 3:1). A proporção óleo de andiroba:diestearato de glicerila no CLN foi de 1,5:1, enquanto o volume final da dispersão foi de 100 mL. O Tac na formulação contém 1,11% (m/m) do conteúdo anidro (lipídeos mais surfactantes), correspondendo a uma concentração de 11,11 mg/g de tacrolimus na massa anidra.

CLN contendo Tac (Tac-CLN) foram preparados aquecendo a fase oleosa, exceto o Tac, e a fase aquosa, separadamente a $70 \pm 10^\circ\text{C}$, até fusão dos lipídeos. Logo após a fusão dos lipídeos, Tac foi adicionado na fase oleosa até sua completa solubilização.

Posteriormente, a fase aquosa foi vertida sobre fase oleosa sob agitação em ultraturrax® a 9500 rpm por 3 min. Imediatamente após o tempo previsto de agitação, a emulsão formada foi levada ao microfluidizador a 1000 bar por 5 ciclos, para reduzir o tamanho das gotículas. A nanoemulsão obtida foi recolhida em frasco de vidro neutro e resfriada em temperatura ambiente, para solidificação dos lipídeos e formação dos Tac-CLN. Decorridas 24 h da sua manipulação, a formulação foi armazenada sob refrigeração a 4°C para caracterização.

4.6.2 Produção do biohidrogel híbrido contendo Tac-CLN

O veículo selecionado para incorporar os Tac-CLN foi composto por uma mistura do polissacarídeo semissintético derivado da celulose, a hidroxietilcelulose (HEC) (Natrosol®, Pharmanostra, São Paulo, Brasil) com o biopolímero da cana-de-açúcar, obtido pela ação de bactérias da espécie *Zoogloea* sp (ZBP), gentilmente cedido pelo Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, Brasil, através do professor José Lamartine A. Aguiar. Os componentes da formulação do biohidrogel híbrido (ZBP-HEC) estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Composição do biohidrogel híbrido ZBP-HEC.

Componentes	Concentração (%)
HEC	1,0
Nipagin	0,2
Nipasol	0,02
Propilenoglicol	10,0
Etanol	q.s
ZBP (q.s.p)	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: HEC (hidroxietilcelulose), ZBP (biopolímero da *Zoogloea* sp), q.s (quantidade suficiente), q.s.p (quantidade suficiente para).

O ZBP-HEC foi preparado solubilizando o nipagin e nipasol em q.s de álcool absoluto em béquer de 100 mL com posterior adição do propilenoglicol. A HEC foi dispersa na mistura

anterior sob agitação manual com bastão de vidro, onde posteriormente foi-se adicionado o ZBP. A dispersão polimérica híbrida foi deixada em repouso durante 24 h para intumescimento da HEC, protegida do calor, luz e umidade.

Após o tempo previsto, a formulação foi levada ao banho-maria a 60°C sob agitação constante até completa homogeneização e aumento da viscosidade. O biohidrogel híbrido ZBP-HEC formado foi acondicionado em frasco de vidro, fechado hermeticamente e armazenado sob refrigeração.

Os Tac-CLN foram incorporados no biohidrogel na proporção de 1:1 (m/m), sobre lenta e constante homogeneização com o objetivo de se produzir uma formulação farmacêutica com concentração final de Tac de 1,0 mg/g de biohidrogel (Tac-CLN/ZBP-HEC). Para estudos de permeação cutânea, formulações de biohidrogéis contendo Tac a 0,1 % (1 mg/g, Tac/ZBP-HEC ou 5,55 mg/g de Tac na massa anidra) e contendo apenas Tac-CLN (1 mg/g) foram desenvolvidas seguindo o protocolo anterior. Todos os géis produzidos foram acondicionados em frasco de vidro, fechado hermeticamente e armazenado sob refrigeração.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DE CLN

CLN contendo ou não tacrolimus, veiculados ou não no biohidrogel foram caracterizados por análise térmica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espalhamento de luz dinâmico, potencial eletrocinético, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e a determinação da eficiência de encapsulação do fármaco.

4.7.1 Análise térmica

O analisador termogravimétrico simultâneo TGA/DSC 2 STAR^e (Mettler-Toledo, Suíça) foi utilizado para avaliar as variações das propriedades físicas e os produtos de reação das amostras. O equipamento foi operado a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e faixa de temperatura de 25 a 400°C. O ensaio foi conduzido sob atmosfera de nitrogênio com um fluxo de gás de 50 mL/min. Um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência. O sistema calorimétrico foi calibrado em temperatura de transição e mudanças de entalpia, seguindo o procedimento do equipamento, utilizando índium como padrão. Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram colocados nos cadinhos de alumínio, fechados hermeticamente e submetidos às análises.

Os dados obtidos nas análises térmicas foram tratados a partir das áreas dos picos usando o programa Mettler STAR^e versão 16.0.

As medições de TG/DSC foram realizadas para as seguintes amostras: óleo de andiroba (OA); diestearato de glicerila (Pre); lipoid® E80 (LE80); polisorbato 80 (PS80); mistura física dos componentes da formulação (MF); tacrolimus (Tac); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus (Tac-CLN); biohidrogel híbrido (ZBP-HEC); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba veiculados no biohidrogel híbrido (CLN/ZBP-HEC); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus e veiculados no biohidrogel híbrido (Tac-CLN/ZBP-HEC).

Para o cálculo do IC dos CLN contendo ou não Tac e incorporados ao ZBP-HEC, a equação 3 foi utilizada, onde $\Delta H_{Amostra}$ é a entalpia de fusão dos CLN com ou sem Tac e incorporados ou não de ZBP-HEC, $\Delta H_{Bulk\ Lipídico}$ é a entalpia de fusão da MB de OA:Pre (60:40) e a $C_{Fase\ Lipídica}$ é a concentração de Pre na formulação. Análises realizadas no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas da UFPE.

$$IC = \frac{\Delta H_{Amostra}}{\Delta H_{Bulk\ Lipídico} \times C_{Fase\ Lipídica}} \times 100 \quad (3)$$

4.7.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Para a obtenção dos espectros de FTIR as amostras foram analisadas utilizando o espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier 4600 séries, equipado com o sistema de RTA (ATR-PRO ONE, Jasco, Easton, EUA) com placa de cristal de ZnSe (7,2 x 1,0 cm²), área de contato de 2,5 mm, ângulo de incidência de 45°. As amostras foram colocadas no dispositivo RTA sem tratamento prévio e 32 varreduras foram realizadas para cada espectro, com resolução de 4 cm⁻¹ e velocidade de varredura de 2 mm/s.

Os espectros foram coletados entre 4000 e 600 cm⁻¹ e as análises foram tratadas através do programa Spectra Manager®. Análises realizadas no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas da UFPE.

As medições de FTIR foram realizadas para as seguintes amostras: óleo de andiroba (OA); diestearato de glicerila (Pre); lipoid® E80 (LE80); polisorbato 80 (PS80); mistura física dos componentes da formulação (MF); tacrolimus (Tac); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de

andiroba contendo tacrolimus (Tac-CLN); biohidrogel híbrido (ZBP-HEC); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba veiculados no biohidrogel híbrido (CLN/ZBP-HEC); carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus e veiculados no biohidrogel híbrido (Tac-CLN/ZBP-HEC).

4.7.3 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

Após 24 h de produção dos CLN, o tamanho e o índice de polidispersão foram determinados utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), através do Zetasizer® nano ZS90 (Malvern instrumentos, São Paulo, Brasil), equipado com um raio laser de 633 nm, com espalhamento óptico fixo a 90°, utilizando cubeta descartável de poliestireno de 10 mm. Amostras foram diluídas a uma razão de 1:100 utilizando água ultra purificada e 3 medições foram realizadas a 25°C. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (VARENNE et al., 2016).

Para determinação do potencial eletrocinético ou PZ, os CLN foram diluídos em uma solução de cloreto de sódio 1 mM (VARENNE et al., 2015) na proporção de 1:100 e inserida em cubeta descartável de policarbonato DTS 1060C. Foram feitas 3 determinações para cada análise. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.7.4 Difração de raios X

DRX foi utilizada para investigar a estrutura cristalina dos nanossistemas. Os padrões de DRX foram registrados à temperatura ambiente (20-25°C). O material foi montado em um suporte de amostras de vidro e os padrões de DRX foram registrados usando um sistema de difratômetro de Bruker AXS D8 Advance (Karlsruhe, Alemanha) equipado com um goniômetro teta/teta configurado na geometria Bragg Brentano com um suporte de amostra fixo, usando uma fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,15419$ nm) e um detector LynxEye. A tensão e a corrente elétrica aplicadas foram de 40 kV e 40 mA, respectivamente. A largura da fenda usada para o feixe incidente na amostra foi de 0,6 mm. As amostras foram digitalizadas entre (2θ) 2-80 ° em um modo de varredura por etapas (tamanho do passo 0,01 e 5 s).

As amostras estudadas foram os carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus (Tac-CLN). Estudo realizado no departamento de física da Universidade Federal do Ceará.

4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus (Tac-CLN) foi observada usando a MEV (TESCAN MIRA3, República Tcheca). As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 em água ultrapurificada e 10 μL da diluição foram espalhados na superfície da fita adesiva dupla face de carbono (Hatfield, Pensilvânia, Estados Unidos), montadas em suportes de alumínio. As amostras foram então armazenadas em dessecador por 24 h para evaporação da água. Após secas, as amostras foram levadas para o metalizador Q150T ES (Quoru, Ashford, Inglaterra) e submetidos a uma atmosfera de argônio com ouro sob vácuo. A metalização foi realizada com uma corrente de 20 mA por 5 min. O microscópio eletrônico de varredura foi operado sob vácuo em uma voltagem de aceleração de 10 kV. Análises realizadas no departamento de física da UFPE.

4.7.6 Determinação da eficiência de encapsulação de Tac-CLN

Para quantificação do Tac encapsulado nos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba, as amostras foram analisadas pelo método descrito por Nam et al., (2011) e Lapteva et al., (2014a), com algumas modificações, usando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no espectro do ultravioleta (UV). O sistema cromatográfico (Aliance 2695, Waters, Milford Massachusetts, USA), acoplado ao detector de arranjos de fotodiodos (DAD) 2998 (Waters, Milford Massachusetts, USA) foi operado a um comprimento de onda em 210 nm. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm , X Bridge® Waters) protegida por uma pré-coluna com mesma composição (20 mm x 4,6 mm). A separação do Tac foi realizada em modo isocrático a 40°C. A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoracético a 0,05% na proporção de 80:20 (v/v). A taxa de fluxo foi estabelecida em 1,2 mL.min⁻¹ e o volume de injeção no sistema de 50 μL . O pico de Tac foi obtido em aproximadamente 5,2 min e um tempo de corrida de 10 min. O programa Waters Empower® 3 foi utilizado para integração e análise dos dados.

Três curvas analíticas autênticas para doseamento do Tac foram preparadas nas concentrações de 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 40 $\mu\text{g/mL}$ em acetonitrila. As diluições foram injetadas no CLAE e as áreas das curvas foram integradas. Posteriormente, estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável

dependente (y). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

A quantificação do Tac nos CLN foi determinada adicionando 100 µL de Tac-CLN (2,0 mg/mL) correspondendo a 20 µg de Tac em 100 µL de formulação (1,11 µg/µg de Tac na massa anidra) em balão volumétrico de 10,0 ml contendo acetonitrila. O balão foi levado ao vórtex por 2 min. A dispersão foi transferida para tubo de centrifugação com tampa de rosca e levado ao banho de ultrassom a 50°C durante 30 min. Posteriormente, o tubo foi então submetido à centrifugação a 10.000 rpm (~ 12298 g) por 10 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado usando filtro de 0,22 µm de porosidade. A solução foi injetada no CLAE utilizando as condições cromatográficas descritas anteriormente. As áreas dos picos foram integradas e a concentração de Tac encapsulado no CLN foi calculada através da equação da reta previamente obtida.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada pela determinação da quantidade de fármaco livre no Tac-CLN usando a tecnologia de ultrafiltração (YU et al., 2016). Três amostras de 500 µL da dispersão de Tac-CLN (correspondendo a 2,0 mg/mL ou 1,11 µg/µg de Tac na massa anidra) foram adicionadas na câmara superior da célula de ultrafiltração (Amicon ultra, Millipore, MWCO 10 kDa) e levadas para a microcentrífuga (Tomy, TX-160, Jacarta, Indonésia) a 5.000 (~ 4192 g) durante 30 min. Após centrifugação, 50 µL do filtrado foram diluídos em acetonitrila e analisados por CLAE.

A quantidade de fármaco não encapsulado foi calculada através da integração das áreas dos picos utilizando a equação da reta obtida. Após cálculo da concentração de fármaco encontrada, a EE% foi determinada através da equação 4, onde: Tac_{Total} é a concentração de fármaco encontrado no doseamento do Tac-CLN e Tac_{Livre} é a concentração de Tac quantificada no filtrado.

$$EE\% = \frac{Tac_{Total} - Tac_{Livre}}{Tac_{Total}} \times 100 \quad (4)$$

4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Para se avaliar a estabilidade das formulações elaboradas, 2,0 mL de cada formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba e carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba veiculados no biohidrogel híbrido (CLN e CLN/ZBP-HEC) foram submetidos à centrifugação, a fim de verificar a ação da força centrífuga na sedimentação e/ou separação de fases das amostras. O ensaio foi conduzido em uma

ultracentrífuga (Kubota, KR-20000T, Japão) a 3.000 rpm ($\sim 1106\text{ g}$) durante 30 min. Posteriormente ao teste de centrifugação, aproximadamente 15,0 mL das formulações foram acondicionadas em tubos de vidro neutro, deixando um espaço vazio (*headspace*) para possíveis trocas gasosas. Além disso, recipientes contendo as amostras foram fechados hermeticamente e armazenados sob refrigeração a 4, 25 e 40°C. As amostras foram avaliadas através dos parâmetros de D, PDI, PZ e pH. Os estudos foram realizados nos tempos de 24 h, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

4.9 PERMEÇÃO/PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE TAC-CLN

Para avaliar as possíveis interferências do método de extração, identificação e quantificação do tacrolimus por HPLC, foi realizado um estudo de seletividade usando diferentes matrizes. Posteriormente à validação do método analítico de seletividade, o ensaio de permeação/penetração foi conduzido usando células e Franz e orelhas de porco como membrana.

4.9.1 Seletividade do método de extração e doseamento do tacrolimus frente a interferentes da formulação e da matriz biológica

Orelhas de suínos foram adquiridas do matadouro no município de Paulista (Pernambuco, Brasil), recolhidas imediatamente após o abate do animal, armazenadas e transportadas em caixa térmica com gelo. No mesmo dia do abate, as orelhas foram tratadas lavando-as em água corrente para retirada dos resíduos e dispostas sobre uma superfície limpa; com auxílio de pinça e bisturi a pele foi seccionada longitudinalmente separando a cartilagem. O tecido adiposo subjacente à pele foi excisado e os pelos foram cuidadosamente aparados com auxílio de tesoura cirúrgica. A pele tratada foi então cortada em discos de aproximadamente 3,0 cm de diâmetro, acondicionadas em filme plástico transparente de PVC e armazenadas em freezer com temperatura de -20°C por no máximo de 30 dias até o experimento.

A seletividade do método bioanalítico foi conduzido seguindo as diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) n° 428 e o documento correspondente de orientação técnica n° 28 (OECD, 2004a, 2004b). Esta diretriz é aceita por muitos órgãos reguladores e está de acordo com o objetivo de reduzir os testes em animais (GUTH et al., 2015).

Seis amostras distintas oriundas da matriz dos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN), biohidrogel híbrido (ZBP-HEC), estrato córneo (EC), pele remanescente (PR) e a fita adesiva, foram utilizadas para realização do ensaio de seletividade. Inicialmente foi preparada uma solução volumétrica de Tac em acetonitrila (1 mg/mL). Em tubo de extração cônico de 15,0 mL foram adicionados 100 mg da matriz contaminante (CLN e ZBP-HEC), em seguida foi-se adicionado 100 µL da solução contendo o Tac e seu volume ajustado para 5,0 mL com acetonitrila, correspondendo a uma concentração teórica de 20 µg/mL de Tac. Os tubos foram fechados e homogeneizados em vórtex por 3 min e logo após levados ao banho de ultrassom a 50°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm (~ 12298 g) por 10 min. Os sobrenadantes foram então filtrados e levados ao CLAE utilizando metodologia já anteriormente descrita. Todas as amostras foram realizadas em sextuplicatas.

A seletividade do método frente à fita adesiva Scotch-Brite® 3M (Sumaré, São Paulo, Brasil), foi realizada inicialmente adicionando 20 fragmentos de fita adesiva, com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, em tubos cônicos de extração de 15,0 mL. Em seguida foi-se adicionado 100 µL da solução de Tac (1 mg/mL) e 4,9 mL de acetonitrila, que correspondeu a uma concentração final de 20 µg/mL de Tac.

Para se avaliar a seletividade do Tac no EC e na PR, seis amostras de pele foram cortadas com tamanho e formato da área doadora de dosagem da célula vertical de difusão de Franz (1,76 cm²), dispostas sobre uma superfície de vidro e o EC foi removido pela técnica de *tape stripping*, onde 20 fitas de aproximadamente 3,0 cm de comprimento foram empregadas. Individualmente as fitas foram aplicadas na superfície da pele fazendo leve pressão e puxando-a de forma abrupta para retirada do EC (PRAÇA et al., 2018).

As fitas foram então colocadas dentro dos tubos de extração, em cada recipiente foi adicionado 100 µL da solução de Tac a 1,0 mg/mL e 4,9 mL de acetonitrila, que correspondeu a uma concentração final de 20 µg/mL de Tac. As peles remanescentes foram então fragmentadas com auxílio de tesoura cirúrgica e colocadas em tubos de extração de 15,0 mL. Em seguida, 100 µL da solução de Tac (1,0 mg/mL) e 4,9 mL de acetonitrila foram adicionados nos tubos, correspondendo também a concentração final de 20 µg/mL de Tac.

Os tubos contendo as amostras com as fitas adesivas, as fitas adesivas do *tape stripping* e a PR foram fechados e homogeneizados vigorosamente em vórtex por 3 min. Subsequentemente, os tubos foram submetidos ao banho de ultrassom a 50°C por 30 min e, então, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (~ 12298 g) por 10 min. Os sobrenadantes

foram coletados e filtrados diretamente em *vials*, levados ao CLAE e as análises cromatográficas foram realizadas de acordo com os parâmetros previamente estabelecidos.

4.9.2 Avaliação permeação/penetração de Tac-CLN nas camadas da pele

O estudo de penetração cutânea em modelo de orelha de porco foi realizado utilizando a célula vertical de Franz, conforme preconizados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), através do *Guidance for Industry, Scale-Up and Postapproval Dosage Forms* (SUPAC SS) e pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), descrito no *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (FDA, 1997; OECD, 2004b).

A pele utilizada para este estudo foi inicialmente preparada conforme descrito no item 4.9.1. O ensaio foi conduzido utilizando as células verticais de Franz (n=5), possuindo uma área difusional de 1,76 cm² e com um volume no compartimento receptor de 7,0 mL. Os experimentos de permeação cutânea foram realizados utilizando o sistema Vision® Microette® plus (Hanson Research Corporation, Califórnia, EUA) formado por um grupo de cinco células verticais de difusão, banho de circulação de água com aquecimento programado (AP007, Polyscience, EUA) com preenchimento e coletor automático. O meio receptor foi mantido sob agitação magnética de 350 rpm a 32 ± 0,5°C.

As células de difusão de Franz foram preenchidas com a solução receptora de dodecil sulfato de sódio (GE healthcare, Bélgica) a 0,5% e as peles já tratadas foram cortadas em forma de discos, com aproximadamente 3,0 cm de diâmetro. Os discos de pele foram dispostos sobre a superfície das células de difusão com o estrato córneo (EC) voltado para cima e a derme (DE) em contato com o meio receptor. Os acessórios do equipamento foram posteriormente acoplados e a temperatura do banho de circulação de água foi ajustada.

Após o sistema Vision® Microette® plus atingir a temperatura programada, 200 mg das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus veiculados no biohidrogel híbrido (Tac-CLN/ZBP-HEC), tacrolimus veiculado no biohidrogel híbrido (Tac/ZBP-HEC) e uma pomada comercial de tacrolimus a 0,1% (1mg/g) (Tarfic®; Libbs Farmacêutica, São Paulo, Brasil) foram aplicados na superfície da pele com auxílio de pipeta automática Multipette® plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e 200 µL dos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba contendo tacrolimus (Tac-CLN), seguindo o princípio da dose infinita, onde permaneceram em contato com a membrana. A quantidade de formulação aplicada em cada amostra corresponde a uma dose de 200 µg de tacrolimus (11,11 µg/µg de Tac na massa anidra) ou 113,64 µg/cm² de pele de orelha de porco.

O equipamento foi programado para coletar 1,5 mL do meio receptor no tempo de 24 h. As amostras coletadas foram filtradas (Millex® de 0,22 µm, Merck Milipore, Alemanha) e a concentração de Tac difundida para o meio receptor foi determinada por CLAE, utilizando metodologia pré-definida.

4.9.3 Quantificação do tacrolimus no estrato córneo

A técnica de *tape stripping* foi usada para remover a camada de EC e determinar quantidade de Tac retido nesta camada da epiderme (EP) (KLANG et al., 2012). As amostras de pele foram retiradas das células de Franz, após o período de 24 h de experimento, fixadas com fita adesiva sobre uma superfície lisa e com o EC voltado para cima, deixando exposta a área em contato com a formulação. Fitas adesivas Scotch-Brite® 3M (Sumaré, São Paulo, Brasil) foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2,0 cm, aplicadas sobre a pele onde fez-se uma leve e constante pressão. A fita adesiva foi puxada de forma abrupta para retirada do EC, desprezando sempre a primeira fita de cada amostra. Esse procedimento foi repetido por 20 vezes (20 fitas) (LADEMANN et al., 2009).

As fitas foram então colocadas em tubo cônico de 15 mL contendo 5,0 mL de acetonitrila. Os tubos foram levados para o banho de ultrassom a 32°C por um período de 1 h. Posteriormente, foram homogeneizados a 150 rpm em incubadora shaker (Bio-Shaker BR-300LF, Taitec, Japão) em temperatura constante de $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por um período de 24 h e logo após foram agitados em vórtex por 2 min. O sobrenadante foi coletado, filtrado e analisado em CLAE utilizando metodologia pré-definida.

4.9.4 Quantificação do tacrolimus na epiderme e derme

A extensão da penetração cutânea foi avaliada pela quantificação do Tac retido tanto na EP quanto na DE, após a realização da técnica do *tape stripping*. Após a remoção do EC, a DE e a EP foram separadas colocando-se a pele em 5,0 mL de água ultrapurificada aquecida a 60°C por 2 min. Após este procedimento, a EP foi removida com auxílio de bisturi e, então, a DE e EP foram cortadas em pequenos pedaços que foram colocados em diferentes tubos contendo 1,0 mL de acetonitrila e submetidos ao vórtex por 2 min (VENTURINI et al., 2015). Posteriormente, os tubos foram levados ao banho de ultrassom aquecido a 32°C durante 1 hora e agitados a 150 rpm em incubadora shaker (Bio-Shaker BR-300LF, Taitec, Japão) em

temperatura constante de $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 h. Cada amostra foi filtrada (filtro de $0,22\ \mu\text{m}$) diretamente em *vial* antes da injeção no CLAE.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média ($\pm$ desvio padrão). As análises estatísticas foram realizadas através de testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (ANOVA e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados, utilizando o programa GraphPad® Prism7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tópicos a seguir apresentarão os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese, assim como as argumentações para os dados obtidos usando comparativamente artigos publicados em periódicos científicos indexados.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDO GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA

A tipificação dos ácidos graxos livres (AGL) do óleo de andiroba (OA) foi realizada por metilação dos tiacilglicerois, após exaustiva derivatização com BF_3 em metanol, e subsequentemente analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

5.1.1 Derivatização do Óleo de Andiroba

A derivatização anterior à análise por CG-EM é uma técnica processual que modifica essencialmente uma funcionalidade do analito de modo a permitir separações cromatográficas mais robustas. Ela aumenta ou diminui a volatilidade do composto de interesse, reduz a adsorção do analito no sistema CG-EM, melhora a resposta do detector e a separação dos picos simetricamente (ORATA, 2012).

Alquilação, acilação e sililação são as três reações realizadas na derivatização, onde materiais altamente polares são tornados adequados para análise por CG, tornando-os suficientes voláteis (EDER, 1995; ORATA, 2012).

A alquilação é normalmente usada como o primeiro passo para posterior derivatização ou como um método de proteção de certos átomos de hidrogênio ativos em uma molécula de amostra. Ela representa a substituição de hidrogênio ativo por um grupo alifático ou alifático-aromático (por exemplo, benzilo) no grupo, processo designado por esterificação. O princípio desta reação é a conversão dos ácidos orgânicos em ésteres, em especial ésteres metílicos que produzem melhores cromatogramas do que os ácidos livres. Em geral, os produtos de alquilação são menos polares do que os materiais de partida porque o hidrogênio ativo foi substituído por um grupo alquilo. Os ésteres de alquilo formado oferecem uma excelente estabilidade e podem ser isolados e armazenados durante períodos prolongados se necessário (EDER, 1995; ORATA, 2012).

Na esterificação, um ácido reage com um álcool para formar um éster. Na reação, um catalisador é recomendado como um ácido inorgânico (ácido clorídrico ou cloreto de tionilo), por exemplo, na transesterificação de gorduras ou óleos (EDER, 1995; ORATA, 2012).

Reagentes de derivatização comuns para reações de alquilação são: dialquilo acetais, diazoalcanos, brometo de pentafluorobenzilo, brometo de benzilo, trifluoreto de boro (BF_3) em metanol ou butanol e de hidróxido de tetrabutylamônio, entre outros. O trifluoreto de boro (BF_3) em metanol ou n-butanol, fórmula geral $\text{F}_3\text{B}:\text{HO}-\text{C}_n\text{H}_{2n} + 1$, onde ($n = 1$ ou 4), é um reagente usado para um método conveniente e barato para a formação de ésteres (EDER, 1995; ORATA, 2012).

OA é composto principalmente de triglicerídeos, com altos níveis de ácido graxos insaturados, principalmente os ácidos oleico (51,81%), palmítico (25,76%), esteárico (9,08%) e linoleico (8,3%) (CABRAL et al., 2013). Seu conteúdo insaponificável varia de 2 a 5% e é formado por triterpenos, esteroides, cumarinas, flavonoides e limonoides, que incluem os tetranortriterpenoides (TNTP): 17 β -hydroxyazadiradione; gedunin; 6 α -acetoxy-gedunin; 7-deacetoxy-7-oxogedunin; 1,2-dihydro-3 β -hydroxy-7-deacetoxy-7-oxogedunin; methylangolensate e xylocensink, estes responsáveis pelas propriedades farmacológicas (HENRIQUES; PENIDO, 2014).

Tradicionalmente, a tipificação e pureza de óleos vegetais são com base na medição da composição de AGL, assim como de mono-(MAG), di-(DAG) e triacilgliceróis (TAG). AGL são obtidos através da hidrólise dos TAG e muitas vezes são derivatizados por esterificação antes da análise cromatográfica. Tanto os AGL derivatizado e os TAG são subsequentemente analisados por CG geralmente com um detector de ionização de chama (FID) ou por meio de CG acoplada a espectrometria de massa (BATAGLION et al., 2014; CABRAL et al., 2013; MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017).

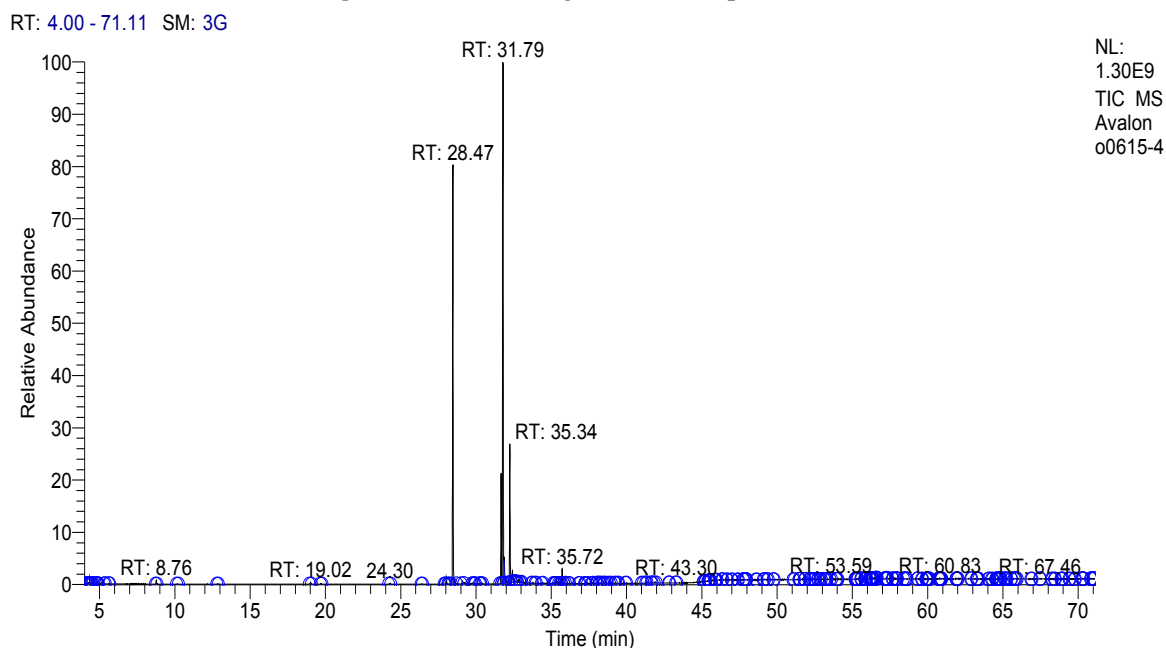
5.1.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas

A CG-EM foi usada para tipificação dos ácidos graxos do OA usado nesta tese. Esta caracterização permitiu a identificação dos compostos graxos que foram inicialmente derivatizados por metilação para permitir sua leitura pelo CG-EM. Os ácidos graxos já foram tipificados em outros trabalhos, porém é de grande importância realizar essas análises em óleos vegetais, pois os produtos naturais apresentam grande variabilidade composicional. Essa identificação e quantificação também permitiu determinar qual a melhor proporção do OA nos

CLN, devido a sua constituição em ácidos graxos na matriz lipídica dos nanosistemas, favorecendo às imperfeições na matriz, conferindo maiores taxas de encapsulação do fármaco.

A figura 22 apresenta o cromatograma total após análises do OA por CG-EM, revelando a presença de três picos principais.

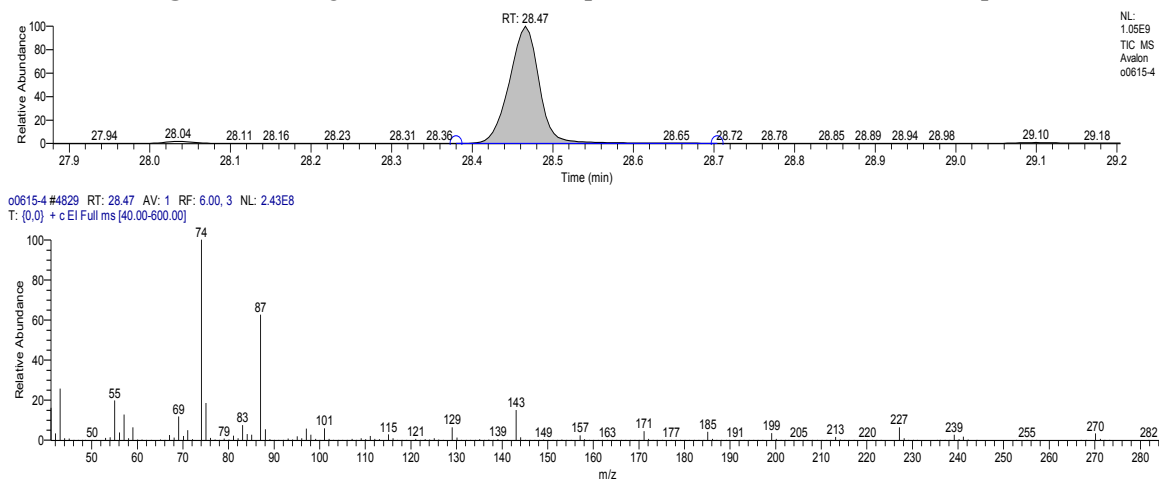
Figura 22 - Cromatograma do OA por CG-EM.



Fonte: Próprio autor.

O pico 1 apresentou o menor tempo de retenção em 28,47 min, representando íons moleculares (M^+) de 74 (m/z), identificado como ácido palmítico (C16:0) pela biblioteca de lipídeos (figura 23).

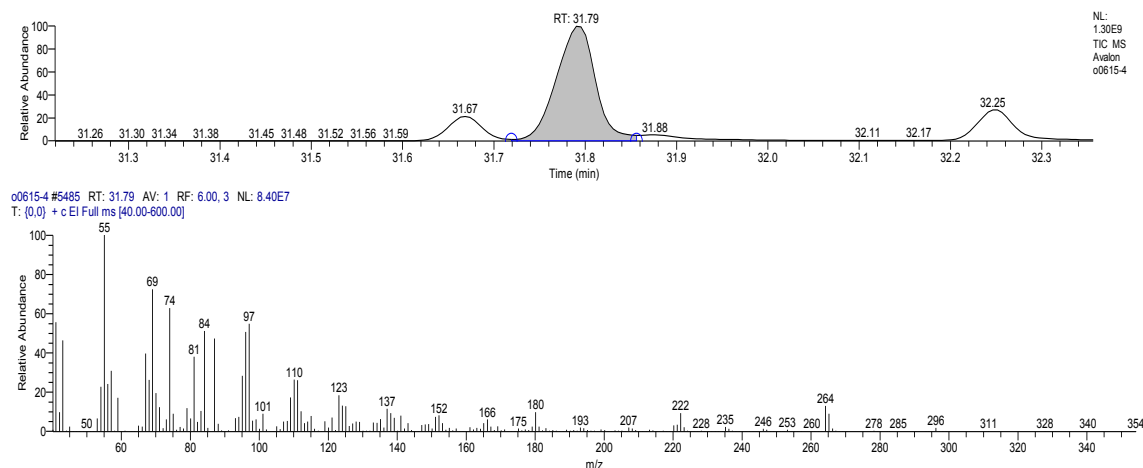
Figura 23 - Fragmentos de massa do pico em 28,47 min do OA obtido por IE.



Fonte: Próprio autor.

O pico 2 foi identificado como sendo o ácido oleico (C18:1), apresentando 31,79 min de tempo de retenção e com M^+ de 55 (m/z) (figura 24).

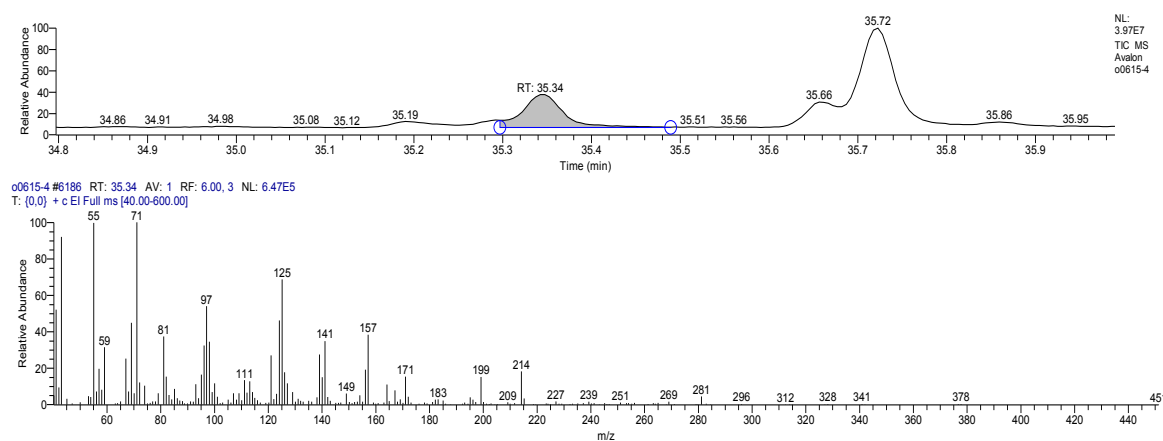
Figura 24 - Fragmentos de massa do pico em 31,79 min do OA obtido por IE.



Fonte: Próprio autor.

O pico 3 com 35,34 min de retenção e M^+ de 55 e 71 (m/z) foi identificado como ácido esteárico (18:0) (figura 25).

Figura 25 - Fragmentos de massa do pico em 35,34 min do OA obtido por IE.



Fonte: Próprio autor.

Estes compostos identificados na amostra já foram previamente relatados na literatura como os maiores constituintes do OA (JESUS et al., 2017). As quantidades relativas calculadas, de acordo com as áreas dos picos, foram de 29,2% para o ácido palmítico, 45,72% para o ácido oleico e 10,94% para o ácido esteárico (tabela 6), valores estes bem próximos descritos em outros estudos com o óleo de andiroba (CABRAL et al., 2013; MELO et al., 2018).

Tabela 6 - Composição dos ácidos graxos presentes no OA obtidos por CG-EM.

Ácidos graxos (Cag:DL)*	Nome do ácido graxo	Concentração (%)**
5:0	Ácido Valérico	0,3
16:0	Ácido palmítico	29,2
16:1n9	Ácido Palmitoleico	0,6
18:0	Ácido Esteárico	10,9
18:1n6	Ácido Linoleico	7,6
18:1n9	Ácido Oleico	45,7
19:0	Ácido Nonadecanoico	1,2
22:0	Ácido Behênico	0,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Onde: * - (Cag) Número de átomos de carbono da cadeia do ácido graxo: (DL) Número de duplas ligações.

nX - Número de átomos de carbono para a primeira ligação dupla contados a partir da extremidade da cadeia de ácido graxo.

** Resultados expressos com concentrações superiores a 0,17%.

Saraiva et al., (2009) tipificaram diversos óleos vegetais amazônicos por espectrometria de massas (EM) com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz de analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF-MS), e concluíram que o OA da amostra analisada apresentou porcentagens relativas maiores de ácidos palmítico e oleico.

Simas et al., (2010) também relataram que a característica mais distintiva dos perfis de TAG do OA foi a maior porcentagem de ácido palmítico, observado pela maior intensidade do íon na EM ambiente com ionização por aspersão supersônica (EASI-MS).

Cabral et al., (2013) reportaram que a amostra do OA analisada revelou concentrações de ácido oleico (51,81%), palmítico (25,76%) e esteárico (9,08%), utilizando a técnica de EASI-MS para tipificar e determinar a pureza de óleos vegetais.

Bataglione et al., (2014) realizaram uma caracterização abrangente de óleos vegetais amazônicos por técnicas de CG-EM e EASI-MS, confirmando os dados já publicados sobre o OA que os componentes majoritários são os ácidos palmítico, oleico e linoleico.

Milhomem-Paixão et al., (2016) também realizaram estudos prévios para investigar a hematoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e as propriedades antioxidantes e lipidoma do OA. Os autores avaliaram duas amostras de OA obtidas de regiões distintas do estado do Pará (Brasil) por CG-EM e verificaram concentrações de 55 e 42% de ácido oleico, 38 e 32% para o ácido palmítico e 0,03 e 14,53% para o ácido esteárico nas diferentes amostras estudadas.

Jesus et al., (2017) realizaram análise na amostra de OA por CG-EM utilizada para produção de uma nanoemulsão. Os autores confirmaram a presença dos ácidos palmítico e oleico como TAG majoritários.

Trabalho de Oliveira et al., (2018), com o OA e suas frações, para verificar a atividade leishmanicida destes compostos, determinaram a composição de ácidos graxos usando a técnica de EM de ionização por eletroaspersão (ESI-MS). Os autores revelaram que os constituintes majoritários de AGL eram representados em maiores proporções pelos ácidos oleico, palmítico e esteárico, respectivamente.

A tipificação de AGL presentes em uma amostra de OA através da CG-EM com EI foi realizada por Melo e colaboradores (2018) em seu trabalho para verificar a genotoxicidade e atigenotoxicidade do OA e uma nanoemulsão obtida com esse óleo. Os autores constataram que as três substâncias predominantes na composição do OA foram o ácido oleico (39,13%), ácido palmítico (33,22%) e ácido linoleico (16,86%).

Os dados observados nos diversos trabalhos aqui apresentados mostram que, dependendo da origem, técnica de extração, purificação e método analítico empregado, o OA pode apresentar variações nas concentrações de AGL, porém, observa-se um certo padrão entre todos os estudos, indicando que o OA possui os ácidos oleico e palmítico como os componentes de maiores proporções.

Esses achados foram muito semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, indicando que o OA aqui estudado apresenta características químicas já descrita na literatura científica, o que favorece a elaboração de sistemas emulsionados adequados para o estudo proposto.

5.2 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE CLN

Os estudos de pré-formulação foram realizados para verificar a melhor proporção de constituintes da formulação, assim como as interações físico-químicas. A seguir serão apresentados os resultados e as discussões que foram observados para se estudar os constituintes da formulação de CLN através de estudos de pré-formulação.

5.2.1 Efeito da mistura física dos lipídeos

Misturas binárias do óleo de andiroba e o diestearato de glicerila foram preparadas e analisadas por termogravimetria e infravermelho com transformada de Fourier para verificar interações e compatibilidades entre os constituintes da formulação de CLN.

5.2.1.1 Análise térmica

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do diestearato de glicerila (Pre) e das misturas binárias (MB) e seus índices de cristalização (IC), e a figura 26 apresenta os seus respectivos termogramas. Inicialmente, através da MB proporcional entre o OA e o Pre, verificou-se, após a adição do OA, a redução da cristalinidade do material através do IC.

A determinação do IC é útil para comparação da cristalinidade entre as formulações desenvolvidas, assim como o desempenho dos CLN, avaliando a percentagem da matriz lipídica que recristalizou durante o tempo de armazenamento.

A caracterização do grau de cristalinidade e da modificação lipídica são parâmetros importantes, pois estão correlacionados com as taxas de incorporação e liberação do fármaco na matriz lipídica (XIA et al., 2007).

Tabela 7 - Resultados de DSC do bulk lipídico e proporções da MB entre o OA e o Pre, com aumento da quantidade de OA de 10 a 90%, correspondendo a quantidades diminuídas de Pre de 90 a 10%.

Taxa de mistura	Pre	10:90	20:80	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	80:20	90:10
OA:Pre										
Entalpia de fusão (J.g ⁻¹)	-152	-148	-120	-123	-88	-95	-97	-61	-35	-16
Início (°C) (ponto médio)	57	44	45	44	42	41	37	37	36	35
Pico máximo (°C)	66	63	62	61	60	59	58	55	54	49
IC (%)	100	97	79	81	58	62	64	40	23	10

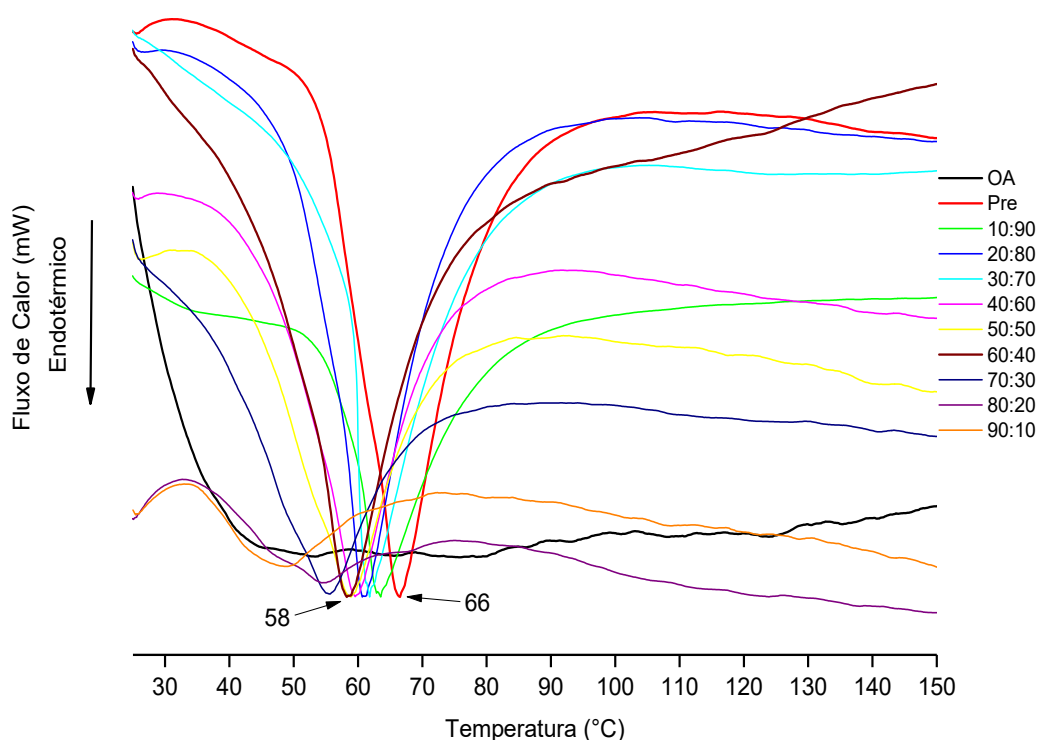
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: São dadas a entalpia de fusão, início da fusão, pico máximo de fusão e IC. O IC foi calculado levando em consideração apenas o Pre como sendo o bulk lipídico. Onde: OA (óleo de andiroba) e Pre (diestearato de glicerila).

Como pode-se observar (figura 26), o Pre puro apresentou um evento endotérmico em 66°C, enquanto que nas MB entre o OA e o Pre esses picos foram decrescendo de acordo com a adição do OA, passando de 66°C a 48°C e o IC (%) reduziu de 100% para 10% na última proporção. A adição do OA na matriz lipídica pode resultar no aumento no número de defeitos na rede cristalina lipídica, causando reduções no IC (%) e no ponto de fusão do Pre. MB apresentam pureza reduzida de cada componente, consequentemente, essas misturas podem apresentar reduzida entalpia (DANTAS et al., 2018).

Uma estrutura cristalina menos ordenada prevê uma maior capacidade de encapsulação na matriz lipídica de nanocarreadores baseados em lipídeos sólidos. Uma mistura lipídica composta de moléculas estruturadas de maneira muito diferente impedirá a formação de um cristal perfeito, proporcionando espaços para acomodar o fármaco na forma molecular ou como aglomerados amorfos, resultando em uma maior taxa de encapsulação (MÜLLER et al., 2007).

Figura 26 - Termogramas de DSC do óleo de andiroba (OA), diestearato de glicerila (Pre) e mistura binária (MB).



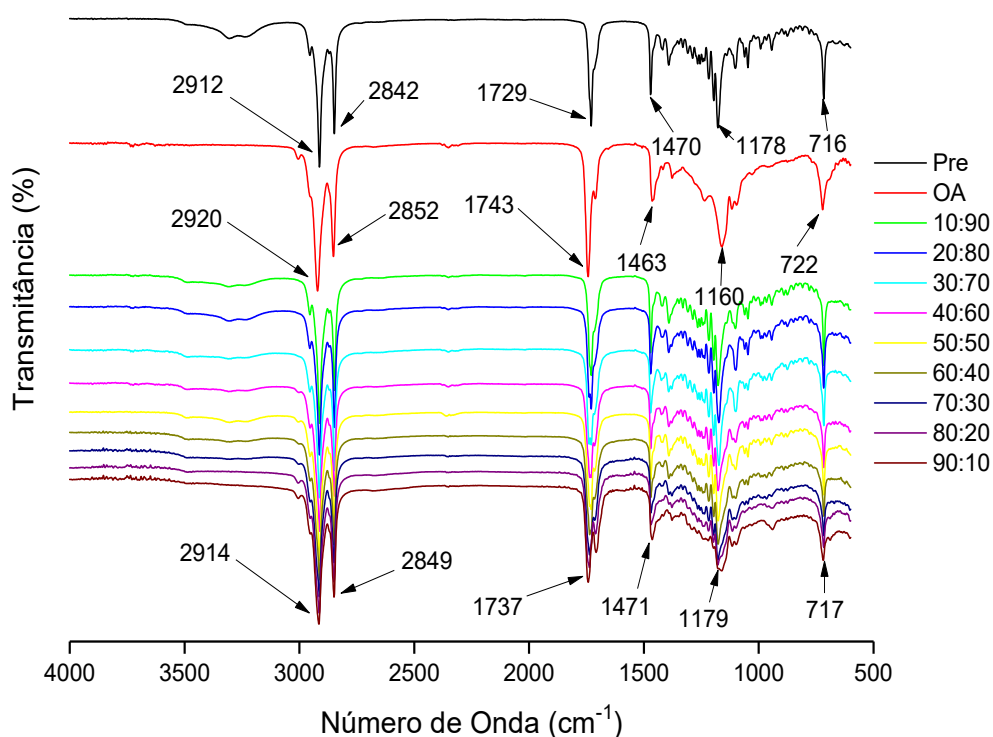
Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados de DSC das MB entre o OA e o Pre, foi selecionada a proporção 60:40 para formação dos CLN e a encapsulação do Tac. Estas proporções justificam-se, pois haveria maior quantidade de OA na matriz lipídica e, conseqüentemente uma provável maior taxa de encapsulação do fármaco. Com um evento endotérmico inicial em 37°C, temperatura próxima a temperatura externa da pele, o que promoveria a retenção e penetração cutânea, com posterior fusão dos CLN e liberação do fármaco em camadas mais profundas da pele. (GARCÊS et al., 2018).

5.2.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do diestearato de glicerila (Pre), do óleo de andiroba (OA) e as misturas binárias (MB) entre OA e o Pre foram estudados para estimar quaisquer possíveis interações químicas (figura 27). Pre apresentou fina e forte vibração de alongamento C-H em 2912 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} , indicando as características hidrofóbicas das longas cadeias alquílicas (KIM; PARK, 2011).

Figura 27 - Espectros de FTIR-RTA do diestearato de glicerila (Pre), óleo de andiroba (OA) e misturas binárias (MB).



Fonte: Próprio autor.

Também foram registrados picos de absorção finos e fortes em 1729 cm^{-1} , indicando estiramento C=O. Uma deformação angular CH_2 em 1470 cm^{-1} , uma banda de absorção em 1178 cm^{-1} característico de deformação de C-N alifáticos foram observados, e uma deformação angular de cadeia em $(\text{CH}_2)_n$ para $n>3$ em 716 cm^{-1} (KUMBHAR; POKHARKAR, 2013).

A análise por FTIR do óleo vegetal cru das sementes de andiroba (figura 27) mostrou algumas bandas principais com características referentes aos grupos funcionais presentes no extrato vegetal, como a deformação axial simétrica em que as ligações de $-\text{CH}_3$ se estendem e

contraem em fase em 2920 cm^{-1} , a deformação axial simétrica de $-\text{CH}_2$ em 2852 cm^{-1} , a deformação axial de $-\text{C}=\text{O}$ de ésteres alifáticos saturados em 1743 cm^{-1} , a deformação angular assimétrica de $-\text{C}-\text{H}$ em 1463 cm^{-1} , a deformação correspondente aos $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ de ésteres saturados entre 1160 cm^{-1} e também uma deformação angular de cadeia em $(\text{CH}_2)_n$ para $n > 3$ em 722 cm^{-1} (SENHORINI et al., 2012).

As bandas de absorção do infravermelho de ésteres alifáticos saturados ($-\text{C}=\text{O}$) das MB aparecem nos mesmos números dos comprimentos de onda dos espectros do Pre e do OA, sem quaisquer novos picos, apresentando apenas um discreto desvio na absorção em 1729 cm^{-1} para 1737 cm^{-1} . Esse deslocamento pode ter ocorrido pelo aquecimento e fusão da mistura OA:Pre, porém ainda nas bandas de absorção de compostos carbonílicos.

As MB resultantes entre o Pre e o OA (figura 27) mostraram bandas resultantes da sobreposição dos dados observados nos espectros de infravermelho do lipídeo sólido e do óleo vegetal.

Os resultados da análise de infravermelho sugerem que não houve interações intermoleculares entre as MB dos lipídeos que serão constituintes das formulações de CLN, apenas interações físicas, o que torna favorável para o desenvolvimento dos nanossistemas lipídicos, o que já mostra compatibilidade entre eles e, também, não havendo modificações nas formas cristalinas dos lipídeos, o que poderia impactar na formação dos nanocarreadores ou expulsão do fármaco quando encapsulado (MÜLLER et al., 2007).

5.2.2 Efeito dos constituintes da formulação

A tabela 8 apresenta as concentrações das substâncias utilizadas no delineamento das formulações. Na primeira etapa do estudo de pré-formulação, a agitação em ultra-turrax®, utilizando o surfactante pluronic® F68, promoveu a formação de abundante espuma, dificultando a passagem de algumas formulações pelo microfluidizador (F1-F6).

A formulação F1 apresentou elevada consistência, não sendo possível sua passagem pelo equipamento. Após resfriamento, as formulações F2, F3, F5, F6, F7 e F8 apresentaram-se muito viscosas, impossibilitando a diluição para determinação do tamanho por DLS. Apenas a formulação F4 foi possível avaliar o D e PDI.

Os surfactantes copolímeros em bloco, como é o caso do Pluronic® F-68, quando em solução aquosa e com o aquecimento apresentam propriedades termorreversíveis, cujo fenômeno é o de termogelificação reversível, caracterizado pela temperatura de transição do sol-gel o que torna as formulações semissólidas pelo agregado micelar com o aumento da

temperatura, devido à desidratação das cadeias hidrofóbicas do óxido de propileno e o empacotamento ordenado das micelas, o que justifica o aumento da viscosidade nas formulações (DUMORTIER et al., 2006).

O uso do Pre nos CLN também aumenta a viscosidade nestes sistemas, estando relacionada com a força da película interfacial provocada pelos tensoativos (FANG et al., 2008). Abaixo de 70°C a viscosidade do Pre aumenta rapidamente (HUANG et al., 2008) e, atrelado a esses fenômenos, o caráter lipofílico pronunciado do Pre, expresso por um baixo EHL de 2, podem ter contribuído para este resultado, sendo uma quantidade elevada necessária de emulsificantes para um núcleo lipídico com alta lipofilicidade ou porcentagem em sistemas óleo-em-água (FANG et al., 2008).

Tabela 8 - Triagem dos componentes da formulação de CLN.

Componentes (%)	Formulação							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
OA	10,0	10,0	10,0	7,5	10,0	10,0	3,5	7,0
Pre	10,0	5,0	2,5	7,5	5,0	5,0	1,5	3,0
Lipoid® S100	1,7	1,7	1,5	1,7	2,0	1,5	0,3	1,0
Pluronic® F-68	1,3	1,3	1,5	1,3	---	1,5	0,5	1,0
Água Purificada (q.s.p)	100	100	100	100	100	100	100	100
D	---	---	---	398,4	---	---	---	---
PDI	---	---	---	0,3	---	---	---	---

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: OA (óleo de andiroba), Pre (diestearato de glicerila), q.s.p (quantidade suficiente para), D (tamanho de partícula), PDI (índice de polidispersão).

--- não possível analisar/ não determinado.

Diante destes fenômenos físicos, o sistema emulsificante Pluronic® F68 foi substituído pelo Tween® 80, um surfactante com um EHL mais baixo, próximo ao do OA, consequentemente menos hidrofílico e formador de pouca espuma, facilitando o uso a altas taxas de cisalhamento (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013; HAN et al., 2008).

A tabela 9 apresenta os resultados de D e PDI das formulações utilizadas na segunda etapa de seleção das substâncias, onde o Pluronic® F68 foi substituído pelo PS80 e o Lipoid® S100 pelo LE80, de acordo com os valores de EHL do OA.

Tabela 9 - Resultados de tamanho (D) e índice de polidispersão (PDI) após segunda triagem da formulação de CLN.

Componentes (%)	Formulação			
	F9	F10	F11	F12
OA	3,0	7,0	7,0	8,0
Pre	7,0	7,0	7,0	12,0
LE80	0,3	0,3	0,67	0,75
PS80	2,4	2,4	2,03	2,25
Água Purificada (q.s.p)	100	100	100	100
D (nm)	188,2 ± 1,5	173,0 ± 3,0	153,0 ± 1,1	188,2 ± 1,5
PDI	0,32 ± 0,0	0,33 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,32 ± 0,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: OA (óleo de andiroba), Pre (diestearato de glicerila), LE80 (Lipoid® E80) PS80 (polisorbato 80), q.s.p (quantidade suficiente para), D (tamanho de partícula) e PDI (índice de polidispersão).

Resultados expressos como média ± DP, n=3.

Todas as formulações testadas neste segundo estudo de otimização dos componentes apresentaram características coloidais, líquidas, leitosas e de aspecto homogêneo, demonstrando que houve a formação dos CLN (figura 28).

Figura 28 - Fotografia de CLN após segunda triagem da formulação.



Fonte: Próprio autor.

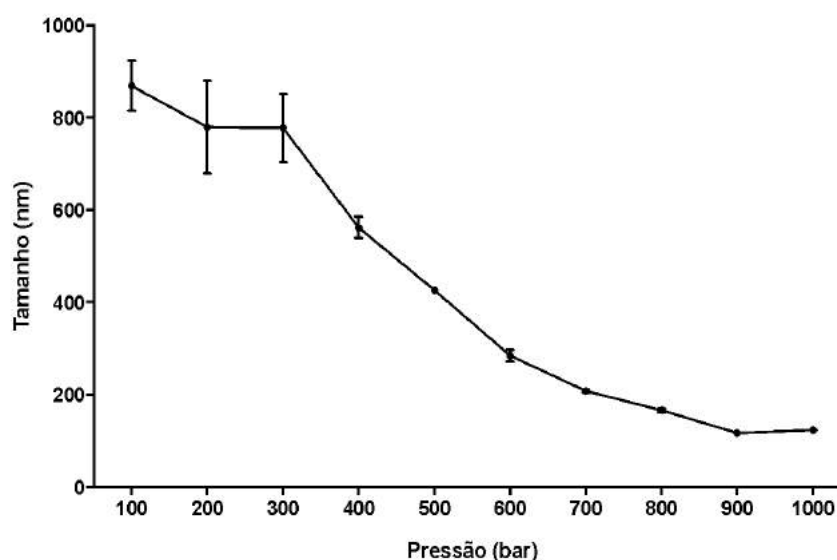
Após substituição do Lipoid® S100 pelo LE80 não houve mudanças significativas no tamanho das partículas dos CLN, que por disponibilidade e motivos econômicos resolvemos trabalhar com este agente co-tensoativo para contribuir com a formação e estabilidade de CLN.

5.2.3 Efeito do processo de produção

Através da variação de pressão e do número de passagens da emulsão pelo microfluidizador foram observadas uma redução acentuada no tamanho (D) dos CLN (figuras 29 e 30). Estes resultados corroboram com estudos anteriores já publicados, pontuando o efeito do número de ciclos e o aumento da pressão em equipamentos como microfluidizador ou homogeneização a alta pressão (HAP) na redução das estruturas de sistemas lipídicos (CHEN et al., 2013; LEE et al., 2014; LIM et al., 2017; QIAN; MCCLEMENTS, 2011). O tamanho dos CLN reduziu de 800 nm para 600 nm quando a pressão foi de 200 para 400 bar (figura 29). Esses valores de D foram progressivamente diminuindo à medida que a pressão do equipamento foi aumentando, mantendo-se constante em aproximadamente 150 nm quando a pressão atingiu 900 e 1000 bar.

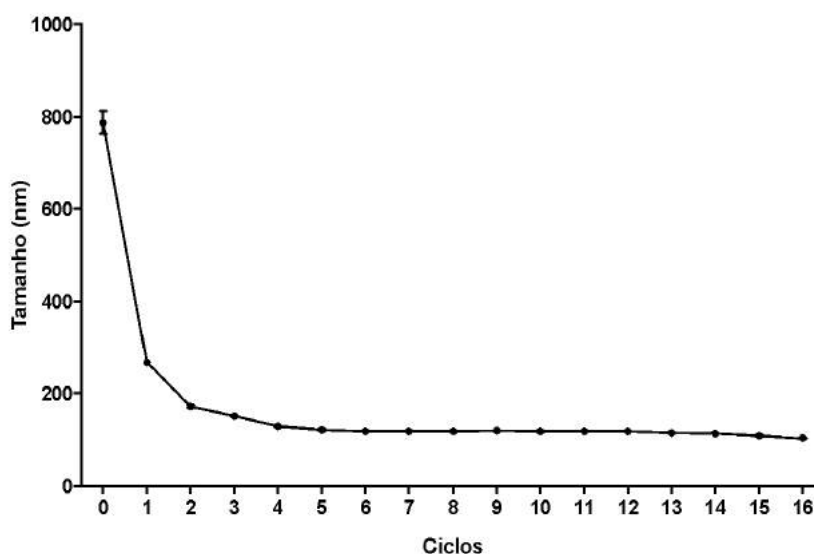
Conduzindo o experimento através do número de passagens da formulação pelo microfluidizador, pode-se observar que o tamanho dos CLN reduziu de 800 nm para cerca de 300 nm já na primeira passagem pelo equipamento. A partir do segundo ciclo os CLN mantiveram tamanhos constantes em cerca de 150 nm até 16 passagens pelo microfluidizador (figura 30).

Figura 29 - Efeito da pressão do microfluidizador no tamanho de CLN (n=3).



Fonte: Próprio autor.

Figura 30 - Efeito do número de ciclos do microfluidizador no tamanho de CLN (n=3).



Fonte: Próprio autor.

Trabalho semelhante foi realizado por Chen et al., (2013) quando da otimização do processo no microfluidizador, desenvolvendo CLN contendo coenzima Q10. Os autores variaram pressão e ciclos no equipamento, e verificaram que o tamanho das partículas diminuía quando da mudança desses parâmetros, porém quando a pressão variava de 1200 para 1600 bar e acima de 3 ciclos não observaram mudanças significativas nos tamanhos.

Estudos com nanoemulsão, usando a técnica de microfluidização, foram conduzidos por Quian e McClements (2011) onde os autores constataram que a média do diâmetro da gotícula diminuía de 1130 nm antes da homogeneização para 231, 214, 180, 177, 168 e 165 nm após uma única passagem pelo microfluidizador a pressões de 4, 6, 8, 10, 12 e 14 kbar, respectivamente. Isto demonstrou que o microfluidizador é particularmente eficiente na formação de pequenos tamanhos de gotículas de emulsões.

Lima et al., (2017) otimizando a preparação de nanopartículas contendo griseofulvina em HAP verificaram também que, alterando a pressão de 500 a 1500 bar com 3 passagens, o tamanho de partícula variava de 175 para 131 nm. Eles também verificaram que a 1500 bar e variando o número de passagens pelo HAP de 1 a 5 vezes, os valores de tamanho de partícula também alteravam de 214 para 112 nm.

Assim, 1000 bar e 5 ciclos foram selecionados como condição ideal para produção de CLN por microfluidização, pois pressão mais elevada e quantidades maiores de números de ciclos não influenciaram na diminuição do diâmetro. O tempo de produção dos CLN foi curto e a microfluidização de alta pressão pode produzir CLN em larga escala, o que é adequado para a produção industrial.

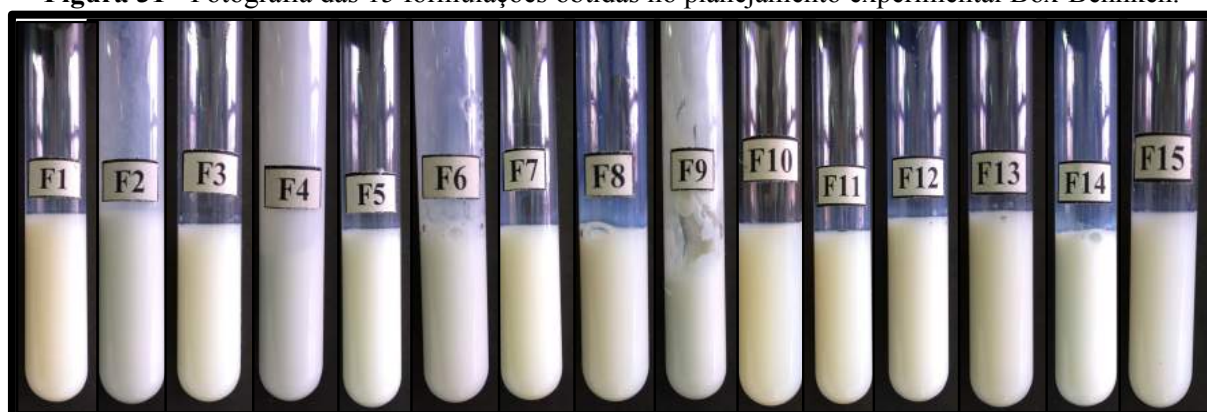
5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CLN

Otimização da produção de CLN foi realizada usando o planejamento experimental Box-Behnken com o objetivo de produzir sistemas com pequenos tamanhos de partícula (D), baixos índices de polidispersão (PDI) e elevado potencial zeta (PZ). Após as definições dos parâmetros ciclos (5 x), pressão (1000 bar), proporção e concentrações mínimas e máximas de surfactantes (SF) Lipoid® E80 e polisorbato 80 (LE80 e PS80) concentrações mínimas e máximas de lipídeo total (LT), concentrações mínimas e máximas de lipídeo líquido (LL), velocidade de agitação da emulsão (9500 rpm), tempo de agitação da emulsão (3 min) e temperatura do banho-maria ($70 \pm 10^\circ\text{C}$), a otimização das formulações foi delineada pelo planejamento fatorial Box-Behnken através da superfície de resposta.

As variáveis independentes mais críticas foram selecionadas baseadas na literatura e nos estudos de pré-formulação, cujos fatores podem influenciar nos parâmetros físico-químicos dos nanossistemas.

Os parâmetros finais que afetaram a natureza dos CLN mais relevantes foram o par de surfactantes (polisorbato 80 e Lipoid® E80) e o lipídeo líquido (óleo de andiroba). O desenho de Box-Behnken produziu 15 formulações diferentes, para as quais as respostas estão resumidas na figura 31 e tabela 10.

Figura 31 - Fotografia das 15 formulações obtidas no planejamento experimental Box-Behnken.



Fonte: Próprio autor.

Os valores das variáveis dependentes das 15 formulações para o tamanho de partícula ficaram entre $118,2 \pm 1,95$ a $699,4 \pm 16,58$ nm; para o parâmetro PDI, os valores variaram entre $0,20 \pm 0,01$ a $0,85 \pm 0,05$ e entre $-11,83 \pm 0,15$ a $-21,37 \pm 0,57$ para os resultados de PZ (tabela 10).

Tabela 10 - Respostas observadas no desenho Box-Behnken para desenvolvimento e otimização das formulações de CLN com os valores preditos gerados pelo programa Statistica® 7.0.

Formulações	Variáveis			Variáveis Dependentes					
	Independentes			Respostas Observadas			Respostas Preditas		
	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	0	1	1	141,23 ± 0,67	0,25 ± 0,00	-16,86 ± 0,31	141,23	0,25	-16,86
2	-1	1	0	202,33 ± 5,28	0,84 ± 0,05	-16,80 ± 0,70	202,30	0,84	-16,80
3	-1	0	1	174,90 ± 1,75	0,39 ± 0,01	-14,20 ± 0,26	174,90	0,39	-14,20
4	-1	0	-1	699,43 ± 16,58	0,59 ± 0,09	-18,70 ± 0,44	699,43	0,59	-18,70
5	1	-1	0	249,60 ± 1,45	0,52 ± 0,02	-20,93 ± 0,47	249,60	0,52	-20,93
6	0	-1	-1	328,16 ± 18,22	0,79 ± 0,17	-21,36 ± 0,57	328,16	0,79	-21,36
7	1	0	1	149,90 ± 2,07	0,40 ± 0,01	-16,10 ± 0,46	149,90	0,40	-16,10
8	0	0	0	164,90 ± 2,70	0,30 ± 0,01	-15,13 ± 0,21	157,27	0,30	-14,94
9	0	1	-1	262,50 ± 1,28	0,42 ± 0,05	-18,60 ± 0,56	262,50	0,42	-18,60
10	0	-1	1	118,23 ± 1,95	0,24 ± 0,01	-15,40 ± 0,79	118,23	0,24	-15,40
11	0	0	0	138,20 ± 1,48	0,20 ± 0,01	-12,76 ± 0,23	157,27	0,30	-14,94
12	1	1	0	138,66 ± 1,72	0,35 ± 0,04	-15,73 ± 0,55	138,66	0,35	-15,73
13	0	0	0	168,73 ± 2,06	0,39 ± 0,03	-16,93 ± 0,31	157,27	0,30	-14,94
14	1	0	-1	141,63 ± 2,85	0,49 ± 0,02	-18,86 ± 0,38	141,63	0,49	-18,86
15	-1	-1	0	175,13 ± 1,81	0,35 ± 0,04	-11,83 ± 0,15	175,13	0,35	-11,83

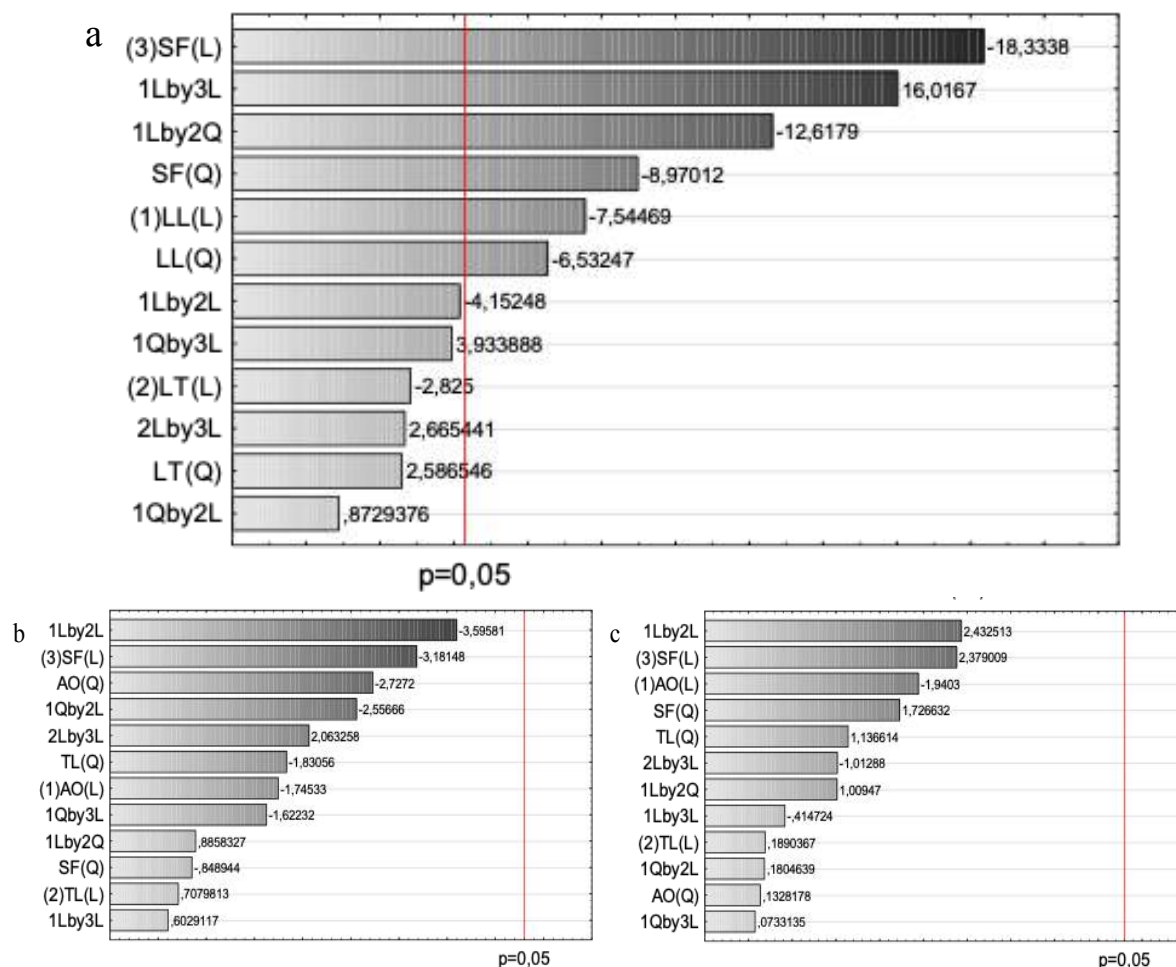
Fonte: Elaborado pelo autor.

Onde: X1= LL, X2 = LT, X3 = SF; Y1 = D (nm), Y2 = PDI, Y3 = PZ (mV).

Os efeitos das interações individuais dos fatores para cada resposta (D, PDI e PZ) foram analisados por gráficos de Pareto. A significância estatística dos fatores e suas interações foram também exploradas usando um gráfico de Pareto, como complemento desta análise, com o qual é possível medir quantitativa e qualitativamente as contribuições de cada fator para as respostas estudadas (figura 32).

O comprimento de cada barra no gráfico corresponde ao efeito padronizado das variáveis independentes e suas interações na resposta. As últimas barras restantes dentro da linha de referência, que correspondem a $p \leq 0,05$, representam os fatores menos contribuintes que não são significativos para a resposta final.

Figura 32 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas: a) tamanho (D), b) índice polidispersão (PDI) e c) potencial zeta (PZ) para o delineamento experimental Box-Behnken de CLN.



Fonte: Próprio autor.

Nota: O comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Os efeitos de todos os parâmetros foram padronizados (cada efeito foi dividido pelo seu erro padrão). A sequência na qual as barras são exibidas corresponde à ordem de importância do efeito. Quando a linha vertical cruza uma barra de efeito no gráfico, indica que este efeito é estatisticamente significativo com 95% de confiabilidade ($p = 0,05$). Onde, SF (surfactantes), LL (lipídeo líquido), LT (lipídeo total); L (modelo linear) e Q (modelo quadrático).

A análise do tamanho das partículas, através do gráfico de Pareto (figura 32a) demonstra que a concentração individual de surfactante e do lipídeo líquido são os fatores que mais afetam essa resposta. O tamanho das partículas parece ser negativamente influenciado pelas concentrações de lipídeo líquido e de surfactante, ambos no modelo linear ($\beta_1 = -145,7$, $p = 0,0032$; $\beta_3 = -82,8$, $p = 0,0099$, respectivamente) o que significa que um aumento nas concentrações de surfactante e lipídeo líquido leva a uma diminuição no tamanho das partículas. Porém, há um nível ótimo de concentração de surfactante que resulta em uma redução da tensão superficial entre as fases lipídica e aquosa, levando a partículas com tamanhos menores e, conseqüentemente, a um aumento na área superficial. No entanto, quando esse nível ótimo de

concentração de surfactante é superado, há saturação, que pode ser atribuída ao acúmulo de excesso de moléculas de surfactante na superfície dos CLN, impedindo novas reduções no tamanho das partículas (PINTO et al., 2019). Por outro lado, o tamanho das partículas é positivamente influenciado pelas concentrações de surfactante e lipídeo líquido no modelo quadrático ($\beta_1=56,6$, $p=0,0226$ e $\beta_3=77,642$, $p=0,0128$).

Através do gráfico de Pareto e análise multivariada foi possível perceber que o efeito individual da quantidade de surfactante foi considerado o fator mais significativo, assim como a interação entre o lipídeo líquido com o lipídeo total. Ambos fatores tiveram um impacto negativo no tamanho dos CLN, o que indica que os melhores resultados devem ser obtidos quando esses fatores são ajustados ao seu nível mais alto (+1). Outro fator que gera impacto no tamanho das partículas é a interação entre o lipídeo líquido com o surfactante, porém esta interação gera uma resposta positiva nos CLN, ou seja, aumento de tamanho (figura 32a). Para as respostas do PDI e PZ, os fatores selecionados nos intervalos não foram estatisticamente significativos (figura 32b, c).

A figura 33 compara quantitativamente os valores experimentais resultantes das respostas com os valores previstos. As respostas apuradas foram geradas para 15 corridas, o modelo de melhor ajuste gerado pelo programa, para todas as variáveis dependentes, foi observado como modelo quadrático com coeficiente de correlação quase igual a 1. O valor do coeficiente de correlação R^2 para tamanho de partícula foi de 0,998 com R^2 ajustado de 0,9980, indicando bom ajuste ao modelo.

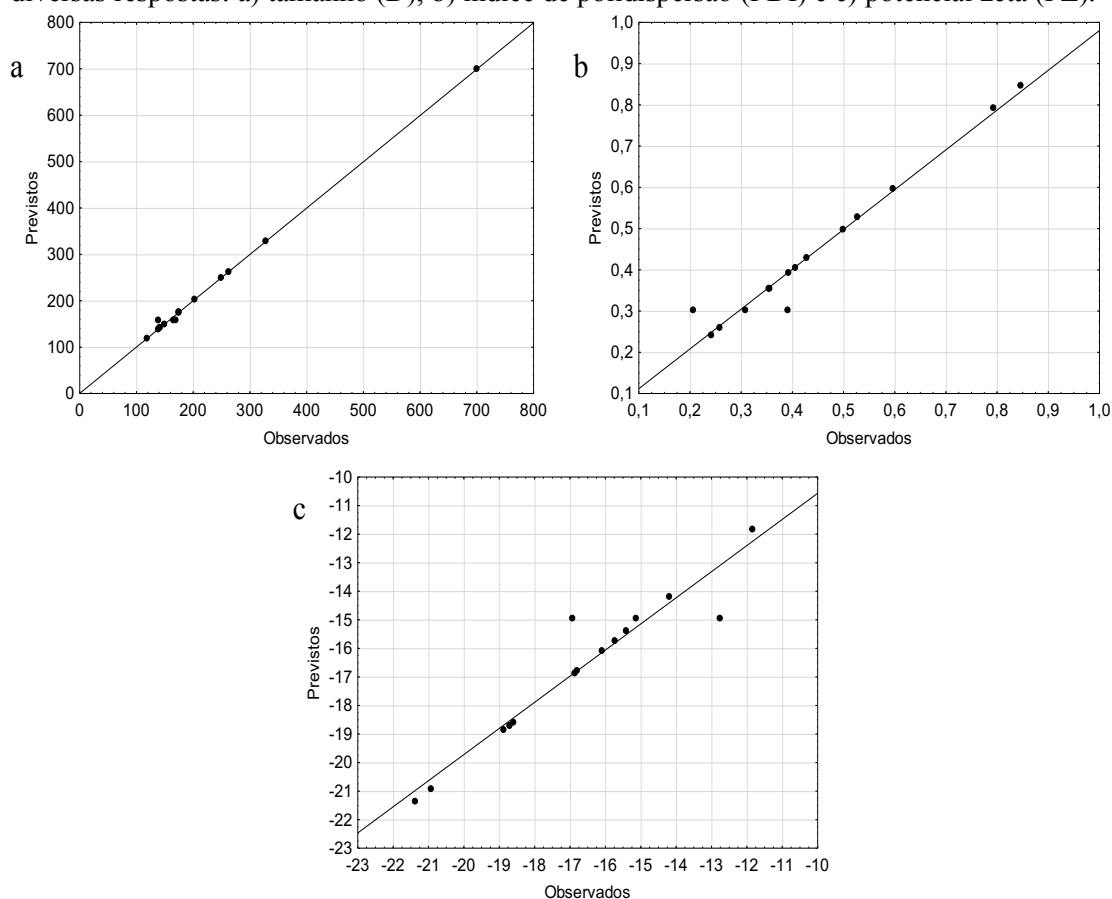
Equação polinomial quadrática foi gerada, representando as interações linear e quadrática para a resposta tamanho de partícula, com base nos dados experimentais obtidos, e a significância de cada coeficiente de regressão foi avaliada estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Os efeitos quantitativos das variáveis independentes e suas interações lineares e quadráticas no tamanho das partículas são representados pela equação 5.

$$Y_1 = 157,3 - 145,7X_1 + 56,5X_1^2 - 82,8X_3 + 77,6X_3^2 + 148,4X_1X_2^2 + 133,2X_1X_3 \quad (5)$$

A expressão matemática de equações polinomiais ou tem valor positivo, que indica que estes efeitos favorecem a resposta final, ou os valores são expressos em termo negativo na equação, que infere relação inversa do fator independente para a resposta final. A equação apresentada refere-se ao fator dependente tamanho de partícula (Y_1). Para as duas respostas também avaliadas, PDI (Y_2) e potencial zeta (Y_3), as equações polinomiais não foram

construídas porque nenhuma variável independente foi estatisticamente significativa no modelo de planejamento gerado.

Figura 33 - Gráficos de correlação linear entre os valores observados e previstos, correspondentes às diversas respostas: a) tamanho (D), b) índice de polidispersão (PDI) e c) potencial zeta (PZ).



Fonte: Próprio autor.

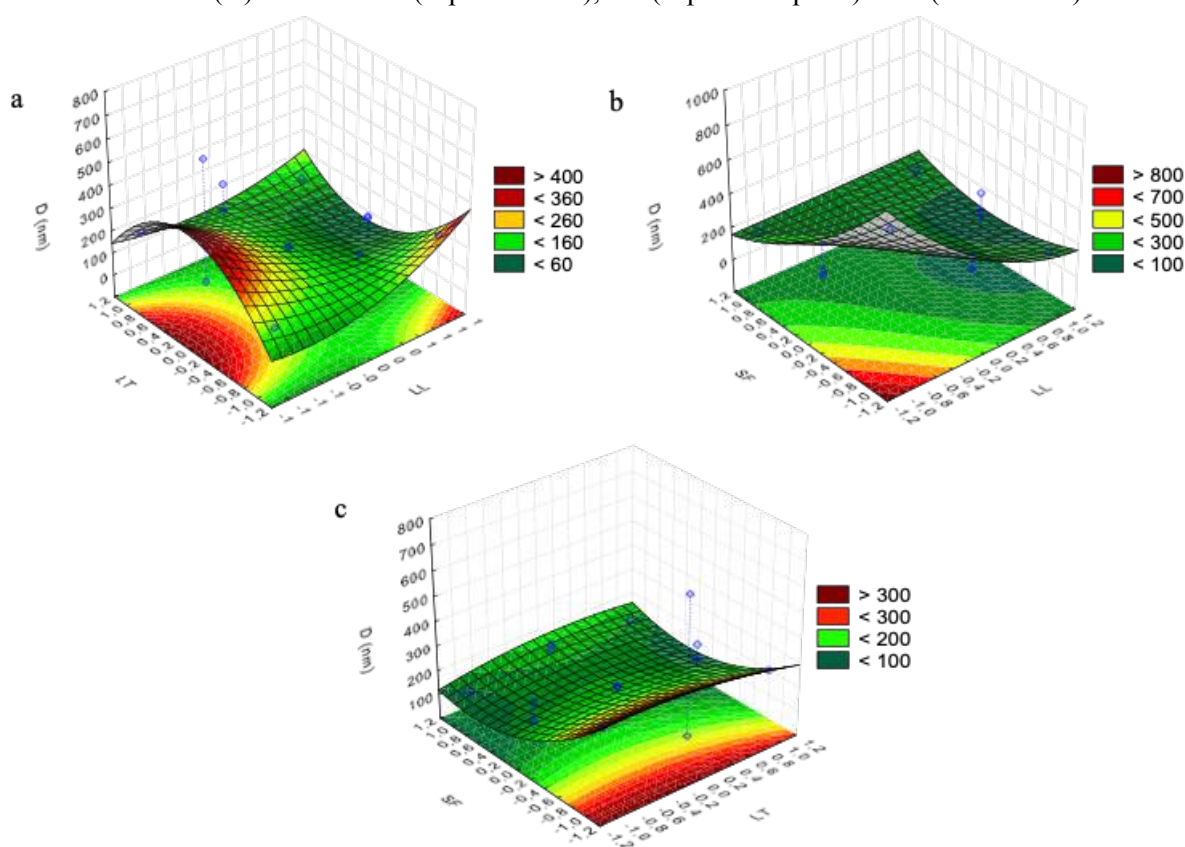
Essa equação é um modelo ajustado para o qual foram utilizados apenas os coeficientes relacionados às variáveis independentes com valores de p significativos ($p \leq 0,05$). Uma variável independente que mostra um valor p mais baixo tem um efeito significativo mais alto na resposta. Para esta resposta tamanho de partícula (Y1), a equação de regressão obtida é estatisticamente significativa ($R^2 = 0,9981$) e revelou que duas variáveis da formulação selecionadas influenciam significativamente no tamanho das partículas, o surfactante e o lipídeo líquido.

O primeiro argumento da equação (157,3) refere-se à média do tamanho das partículas que foi obtida nos 15 experimentos realizados. Os valores positivos antes de um fator (equação 5) têm um efeito sinérgico na resposta, o que indica que esses fatores favorecem a resposta final

e, pelo contrário, valores negativos agem de maneira antagônica, inferindo uma relação inversa da variável independente com a resposta final.

Gráficos tridimensionais de metodologia de superfície para a resposta tamanho de partícula (Y1) foram elaborados para identificar as condições ideais para cada variável dependente (figura 34).

Figura 34 - Gráficos de superfície de resposta 3D mostrando o efeito das variáveis independentes no tamanho (D) de CLN. LT (Lipídeo Total), LL (Lipídeo Líquido) e SF (Surfactante).



Fonte: Próprio autor.

Sabe-se que essas parcelas estudam os efeitos de interação dos fatores nas respostas, bem como são úteis para estudar os efeitos de dois fatores na resposta de uma só vez. Como as demais respostas, PDI e PZ, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, os gráficos de superfície de resposta para estes parâmetros não serão apresentados.

O efeito da concentração do surfactante teve impacto negativo no tamanho das partículas assim como o lipídeo líquido. Além disso, o efeito combinado da concentração do lipídeo líquido com a concentração do lipídeo total impacta também no tamanho das partículas, com efeito positivo na resposta Y1, assim como a interação entre a concentração lipídeo líquido

com a concentração do surfactante. Esses resultados estão de acordo com os gráficos da superfície de resposta (figura 34) e de Pareto (figura 32).

A relação matemática entre os fatores e suas interações sobre o tamanho das partículas são elucidadas nos gráficos de superfície de resposta (figura 34), mostrando os efeitos das interações dos fatores com maior influência no tamanho das partículas. O efeito de X1 (concentração de lipídeo líquido) e X2 (concentração de lipídeo total) e sua interação, X1X2 quando X3 é mantido constante é mostrado na figura 34a.

Ao aumentar simultaneamente as concentrações de lipídeo líquido e lipídeo total, observou-se um aumento no tamanho das partículas, justificando o resultado positivo ($\beta_{12}=+148,4$, $p=0,0062$) dessa interação na resposta. Aumentar o conteúdo lipídico sólido aumentará a viscosidade e a tensão superficial, formando partículas maiores. Em uma microemulsão, a viscosidade da fase interna é diretamente proporcional ao tamanho da partícula. Além disso, a estabilização estérica resultante do surfactante é menos eficaz, gerando maior aproximação das gotículas com consequente coalescência (PINTO et al., 2019).

O efeito de X1 e X3 (lipídeo líquido e surfactante) e sua interação X1X3, e o efeito de X2 (concentração de lipídeo total) e X3 (concentração de surfactante) e sua interação X2X3 são mostrados na figura 34b e 34c, respectivamente. Além disso, há um efeito positivo de X1X3 no tamanho das partículas ($\beta_{13}=+133,2$, $p=0,0038$) (figura 34b). Isso significa que aumentar a quantidade de lipídeo líquido e a concentração de surfactante leva a um aumento no tamanho das partículas. Nesse caso, o efeito de maior viscosidade na matriz de nanopartículas lipídicas é também evidente que promoverá um aumento no tamanho das partículas.

A inclinação do diagrama na figura 34-a indica que o menor tamanho de partícula é alcançado com uma concentração de lipídeo total de 15% (m/m), relacionado com o nível médio (0) no planejamento e uma concentração de lipídeo líquido de 60% (m/m), correspondendo ao nível mais alto (+1). A concentração de surfactante também é significativa na figura 34-b, ilustrando que os menores tamanhos de partícula resultam no nível médio (0) da variável surfactante, ou seja, uma concentração correspondente a 3,0% (m/m).

Conclusão desenhada para o projeto experimental, conforme examinado pelo programa Statistica® 7.0, apresentou informações notáveis e estabeleceu o valor do projeto estatístico para a realização de experimentos com o diestearato de glicerila, óleo de andiroba, polisorbato 80 e o Lipoid® E80 para desenvolvimento de CLN.

Variáveis independentes selecionadas, tais como a razão de óleo de andiroba e diestearato de glicerila, para concentração de lipídeo total, concentração de óleo de andiroba

para lipídeo líquido e razão de PS80 e LE80 para concentração de surfactantes, influenciaram notavelmente as respostas observadas para tamanho de partículas.

O programa Statistica® 7.0 estabeleceu uma equação polinomial que mostra os principais efeitos e fatores de interação entre as variáveis. Além disso, a validação da equação polinomial foi determinada pela técnica ANOVA, acessível no programa. O gráfico de superfície de resposta 3D foi representado para mostrar a influência de variáveis dependentes nas respostas medidas (tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta).

5.4 PREPARAÇÃO DE CLN CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA

CLN foram preparados empregando a técnica de microfluidização com boa reprodutibilidade. Este método utiliza uma bomba para forçar uma pré-mistura de uma emulsão a quente em uma câmara de interação sob alta pressão, para reduzir o tamanho da gotícula. Em comparação com outras técnicas, a microfluidização apresenta como vantagem a preparação de nanossistemas lipídicos com baixo tamanho (D) e índice de polidispersão (PDI) (CHEN et al., 2013; OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017; SONG et al., 2014; ZHAO et al., 2014).

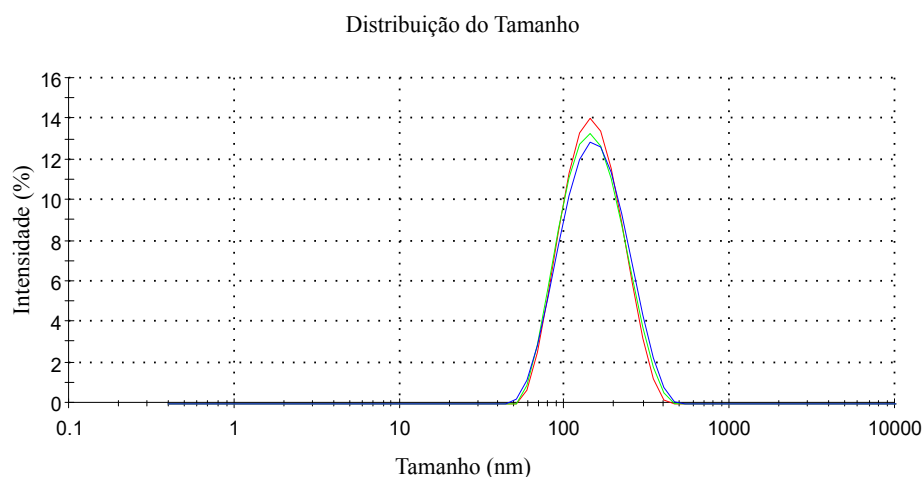
Diestearato de glicerila (Pre), produto dentro da categoria Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) pelo FDA, e o óleo de andiroba (OA) foram escolhidos como LS e LL, respectivamente, porque eles apresentaram boa solubilidade do Tac e, quando homogeneizados e resfriados, a temperatura de fusão da mistura binária (MB), através dos estudos de pré-formulação, ficou compatível com a temperatura da pele, facilitando a liberação do ativo por mecanismo de fusão dos CLN.

Os CLN foram produzidos pela técnica de emulsificação a quente e posterior microfluidização. Após os testes de pré-formulação, a temperatura de preparação da pré-emulsão foi de $70 \pm 10^\circ\text{C}$ e a velocidade de rotação do ultra-turrax® estabelecida em 9500 rpm por 3 min. A formulação otimizada, a partir dos estudos de delineamento experimental Box-Behnken, para um volume total de 100 mL, foi obtida utilizando uma concentração de OA de 9% e o Pre de 6%. O par de tensoativo para estabilização da formulação foi fixado em 3%, utilizando uma mistura de PS80 e LE80 na proporção de 3:1 (2,25 e 0,75%), respectivamente. A pressão do microfluidizador foi padronizada em 1000 bar por 5 ciclos consecutivos de passagem pelo equipamento.

A nanoemulsão obtida foi resfriada em temperatura ambiente e, após 24 h, os CLN formados foram diluídos na proporção de 1:100 em água destilada e caracterizados pela técnica

de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para os parâmetros de D ($130,3 \pm 0,61$ nm), PDI ($0,1 \pm 0,00$), apresentando dispersão homogênea e unimodal (figura 35) e PZ ($-30,2 \pm -1,84$ mV).

Figura 35 - Tamanho das partículas de CLN da formulação otimizada obtida por DLS.



Fonte: Próprio autor.

Os CLN obtidos com o OA apresentaram características fluidas, coloração leitosa, reflexo azulado, quando colocados contra a luz, indicando o efeito Tyndall das partículas coloidais. Não foi observado nenhum indício de cremação, coalescência e separação de fases nas formulações preparadas, indicando boa estabilidade (figura 36).

Figura 36 - CLN obtido pela técnica de microfluidização após otimização.



Fonte: Próprio autor.

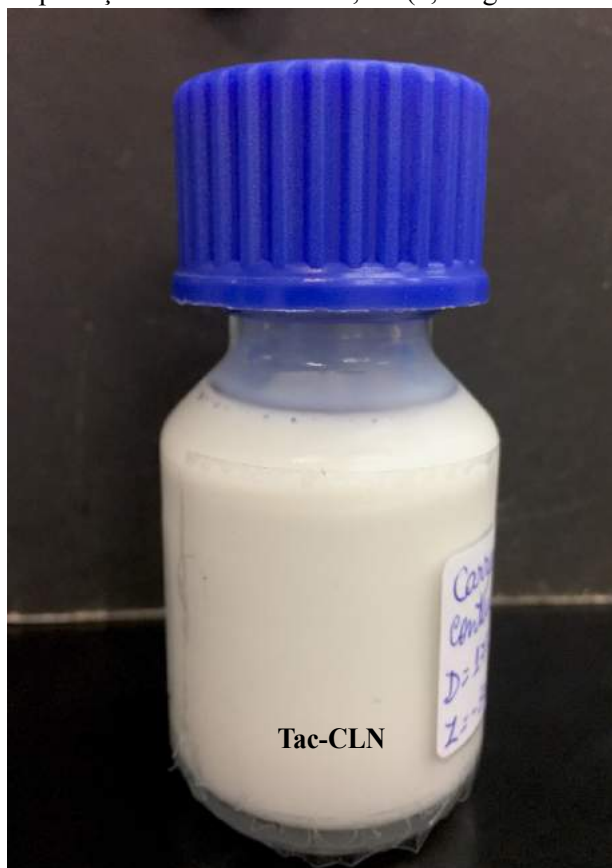
5.5 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLN

Após otimização da formulação de CLN de OA, foi escolhida a formulação que apresentou melhores características de tamanho e PDI, assim como a mais estável e maior capacidade de incorporação de OA, mantendo as partículas no estado sólido. Esta formulação selecionada foi utilizada para incorporar o fármaco tacrolimus, e assim prosseguir com os estudos de desenvolvimento de CLN contendo o ativo, para posterior utilização nos ensaios de penetração e/ou permeação cutânea.

5.5.1 Incorporação de tacrolimus em CLN

A encapsulação do tacrolimus nos CLN (Tac-CLN) foi realizada pela técnica emulsificação e microfluidização com boa reprodução entre amostras. Os Tac-CLN após a produção apresentaram características fluida, branca, sem aspecto visual de sedimentação, floculação ou separação de fases (figura 37).

Figura 37 - CLN após encapsulação do tacrolimus a 0,2% (2,0 mg/mL ou 11,11 mg/g da base anidra).



Fonte: Próprio autor.

5.5.2 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho (D), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das nanopartículas nas formulações preparadas foram detectados pelo Zetasizer® nano ZS90 e estão apresentados na tabela 11. O tamanho da formulação sem o fármaco foi de $130,3 \pm 0,61$ nm, já os Tac-CLN apresentou um tamanho de $139,7 \pm 2,69$ nm. Tamanho este apropriado para a liberação de fármacos na pele.

Tabela 11 - Características das formulações de CLN e Tac-CLN.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
CLN	$130,3 \pm 0,61$	$0,132 \pm 0,01$	$-30,2 \pm 1,84$
Tac-CLN	$139,7 \pm 2,69$	$0,144 \pm 0,01$	$-27,1 \pm 1,23$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Resultados expressos como média $\pm$ DP, n=3.

Segundo Song et al., (2014), quando o tamanho de partículas lipídicas for menor que 200 nm, estas formam uma camada sobre a pele, retardando a perda de água por evaporação, facilitando a penetração do fármaco em camadas mais profundas.

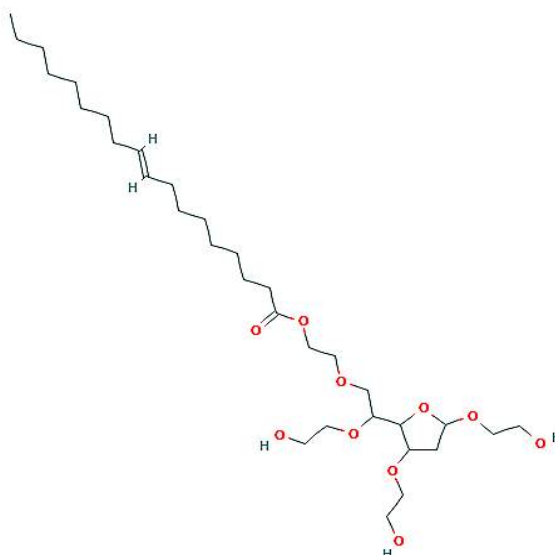
Pode-se observar também que houve um ligeiro aumento no tamanho das partículas lipídicas quando o tacrolimus foi encapsulado nos CLN, porém o fármaco não alterou significativamente as suas características físicas. Resultados semelhantes foram observados por outros trabalhos (DANTAS et al., 2018; NAM; JI; PARK, 2011).

O PDI das formulações CLN e Tac-CLN foi de 0,1, indicando excelente homogeneidade entre as nanopartículas. PDI inferior a 0,3, indica uma distribuição de tamanho estreita e homogênea e ele descreve a intensidade da luz espalhada por muitas frações de partículas diferindo em seus tamanhos e é calculado por $(\text{largura}/\text{média})^2$ para cada pico. Enquanto um $\text{PDI} \leq 0,1$ é considerado como partículas monodispersas, valores de 0,1 a 0,4 são considerados moderadamente dispersos e maiores que 0,4 são altamente polidispersas (BHATTACHARJEE, 2016).

CLN e Tac-CLN apresentaram um PZ de aproximadamente -30,2 mV e -27,1 mV, respectivamente. A molécula do fármaco não alterou de forma significativa o PZ das formulações. O PZ ou potencial eletrocinético (ξ) reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica existente na superfície de partículas eletroforicamente móveis, quando as mesmas estão carregadas eletricamente e são dispersas em um meio, e a camada de dispersante ao redor delas no plano de cisalhamento (BHATTACHARJEE, 2016). O PZ negativo dos CLN

pode ser atribuído ao PS80, que embora este tensoativo seja não-iônico, isto pode ser gerado pela sua estrutura química e a sua hidrólise parcial (figura 38), mas o mecanismo exato é desconhecido (NAM; JI; PARK, 2011).

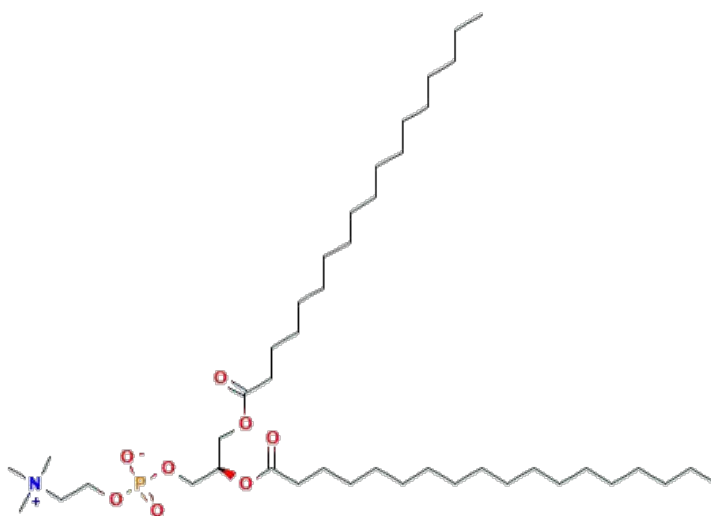
Figura 38 - Estrutura química do polisorbato 80 (Tween® 80): monoleato de sorbitano etoxilado 20 EO.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284448>.

A carga negativa das nanopartículas também pode ser oriunda das frações aniônicas do LE80, constituído por lecitina da gema do ovo (figura 39).

Figura 39 - Estrutura química da fosfatidilcolina da gema do ovo (Lipoid® E80): 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94190>.

O LE80 utilizado neste estudo continha 80% de fosfatidilcolina, fosfolípido zwitteriônico. Os outros componentes (20%) são carregados negativamente, pois possuem lipídeos com grupamentos ácidos (WASHINGTON, 1996). Associados, os emulsificantes PS80 (hidrofílico) e o LE80 (lipofílico), na interface dos CLN podem ser os responsáveis pelas cargas superficiais negativas (FANG et al., 2008).

Segundo alguns autores, a dupla camada elétrica criada na interface de CLN é devido a presença de grupos ionogênicos (-OH, -COOH), originados tanto dos ésteres graxos dos lipídeos (óleo de andiroba e diestearato de glicerila), que podem sofrer ionização e/ou hidrólise, quanto dos surfactantes (polisorbato 80 e lipoid® E80) utilizados para a formação dos nanossistemas, que apresentam uma carga negativa residual (ANDRADE et al., 2017; AVERINA et al., 2011; SONG et al., 2014; TADROS, 2014).

De acordo com a literatura, medir o potencial zeta de CLN permite relacionar com a estabilidade de armazenamento do coloide. Diretrizes classificam as dispersões de nanopartículas com valores de potencial zeta de ± 0 a 10 mV, ± 10 a 20 mV e ± 20 a 30 mV e $> \pm 30$ mV como altamente instáveis, relativamente estáveis, moderadamente estáveis e altamente estáveis, respectivamente (BHATTACHARJEE, 2016).

Em geral, são comuns nos artigos sobre liberação controlada de fármacos a citação que a agregação de partículas é menos provável de ocorrer em partículas com cargas superficiais $|> 25 \text{ mV}|$, uma vez que a maior ionização na interface tende a aumentar a repulsão eletrostática e evitar a agregação.

Portanto, podemos afirmar que os Tac-CLN desenvolvidos neste trabalho apresentou moderada a elevada estabilidade (BHATTACHARJEE, 2016; DANTAS et al., 2018; SONG et al., 2014).

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

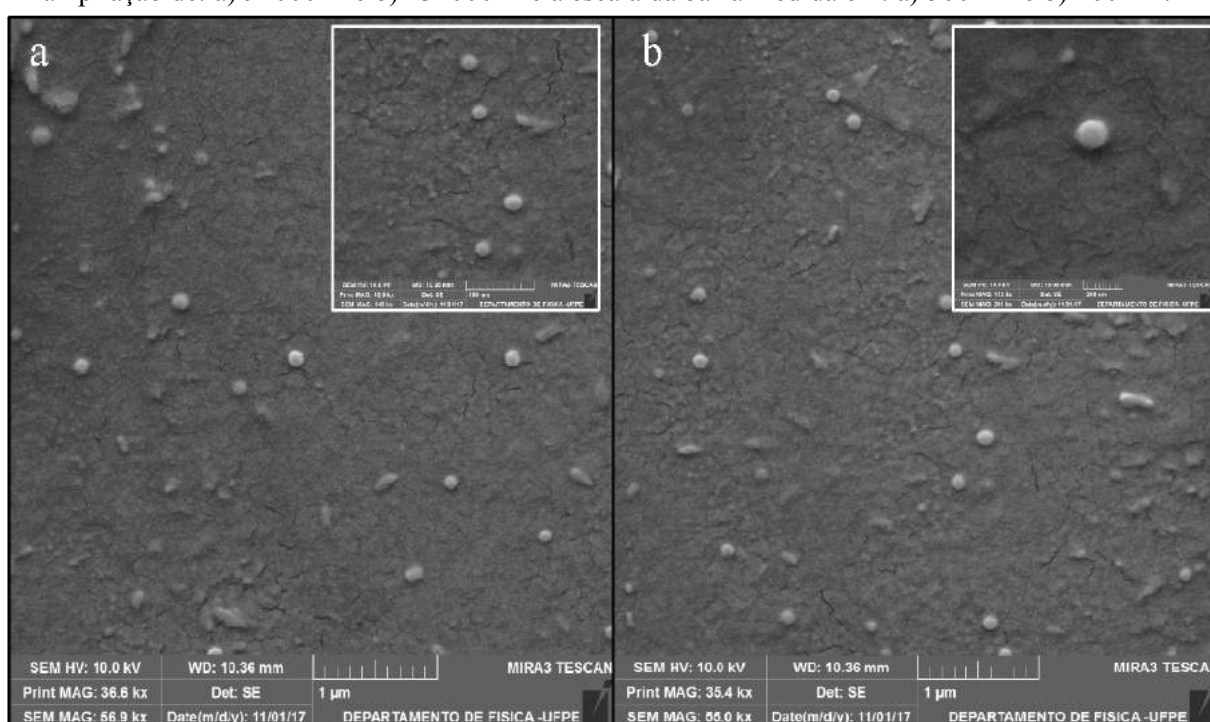
Para obter mais informações sobre tamanho, forma e morfologia da superfície das nanopartículas, fotoeletromicrografias das formulações de CLN e Tac-CLN foram obtidas por MEV, que forneceu informações tridimensionais das nanoestruturas.

Técnicas microscópicas avançadas como a MEV são frequentemente usadas para fornecer informações críticas com relação ao diâmetro, distribuição de tamanho, morfologia, topografia da superfície e até estrutura interna de CLN.

Porém, o uso de feixes de elétrons de alta energia e a condição de vácuo usada na MEV podem causar mudanças na estrutura lipídica instável, provocando desestruturação nas nanopartículas e dificultando a visualização da sua morfologia (TAMJIDI et al., 2013).

A análise por MEV revelou que os CLN e Tac-CLN apresentaram a forma esférica, uniformemente distribuídas e não foram percebidos sinais de aglomeração das partículas (visão geral do campo nas figuras 40a e 40b, respectivamente).

Figura 40 - Microscopia eletrônica de varredura de CLN (a) e Tac-CLN (b) mostrando a distribuição regular e a forma esférica. Imagens captadas com ampliação de: a) 36600 X e b) 35400 X e a escala da barra medida em 1 μm . Em detalhe, mostrando a superfície lisa e uniforme. Imagens captadas com ampliação de: a) 92000 X e b) 132000 X e a escala da barra medida em: a) 500 nm e b) 200 nm.



Fonte: Próprio autor.

Para maiores detalhes, as suas superfícies eram lisas e uniformes, independente da sua composição (figura 40, em detalhe). Não foi percebido aumento de tamanho significativo entre os CLN e Tac-CLN observados por MEV, corroborando com os dados obtidos pela técnica de DLS.

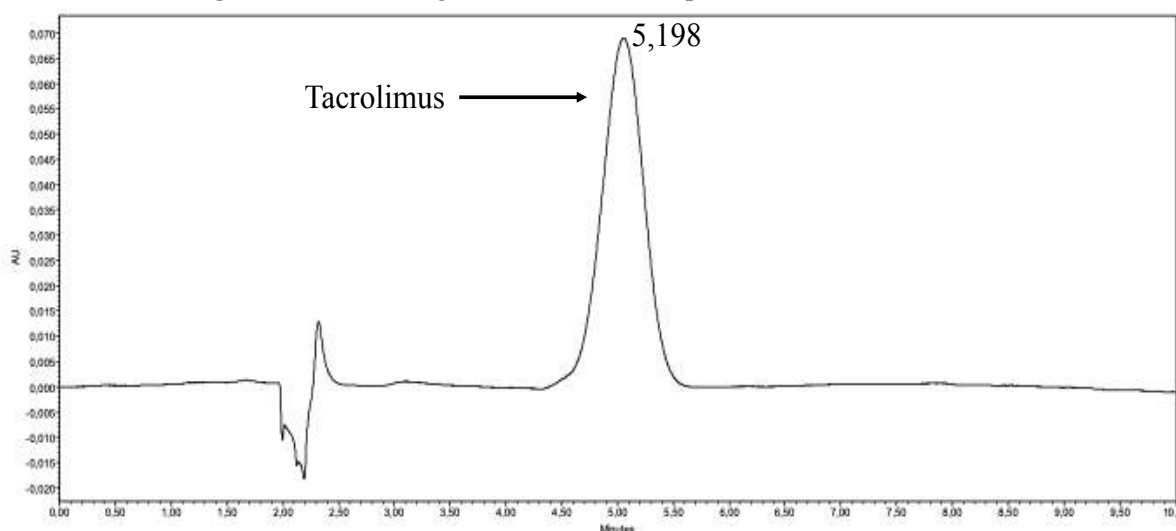
Observa-se também algumas imperfeições nas imagens captadas das nanoestruturas, sugerindo que o nanocompartimento oleoso no interior dos CLN pode tornar as partículas mais vulneráveis ao processo de preparação e obtenção das imagens, usualmente exigido previamente à análise por MEV, como por exemplo serem fundidas facilmente e degradadas (ARAÚJO et al., 2010).

5.5.4 Determinação da eficiência de encapsulação de Tac-CLN

Tacrolimus foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) adaptando os parâmetros de trabalhos já publicados (ANDRADE et al., 2017; BANDE; AGARWAL, 2012; GABRIEL et al., 2016; IQBAL et al., 2012; LAPTEVA et al., 2014a; NAM; JI; PARK, 2011; PATEL et al., 2011).

A fase móvel foi constituída de acetonitrila, água e ácido trifluoracético a 0,05% na proporção de 80:20, bombeada a um fluxo constante de 1,2 mL/min e o Tac foi detectado em 210 nm. A coluna foi mantida a 40°C com um volume de injeção de 50 µL. Nestas condições, um pico simétrico do Tac foi visualizado com um tempo de retenção (tR) de aproximadamente 5,2 min (figura 41).

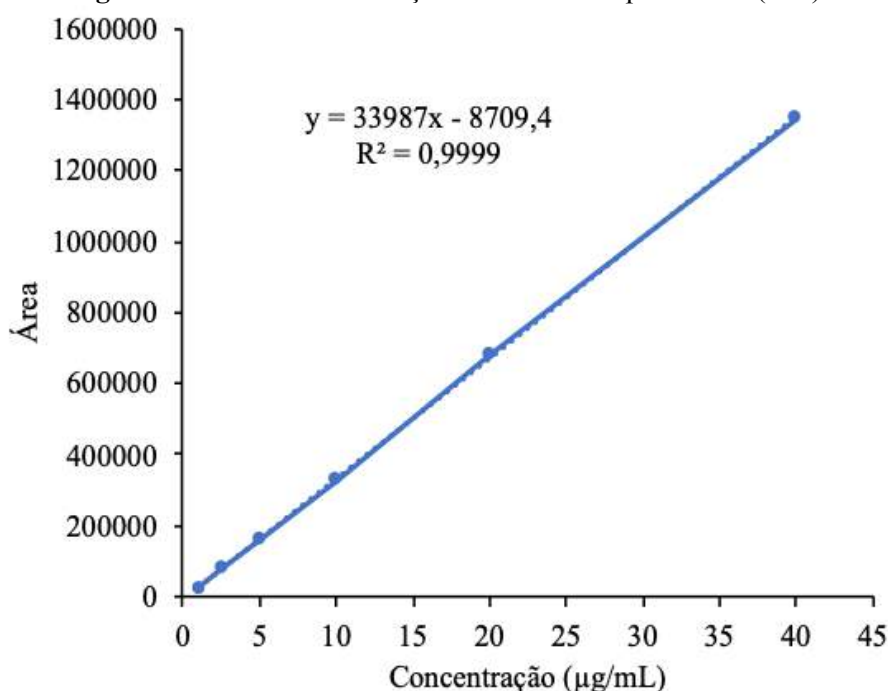
Figura 41 - Cromatograma do Tac obtido por CLAE em 5,198 min.



Fonte: Próprio autor.

A curva de calibração, obtida pela plotagem da área do pico relativo em relação à concentração da solução volumétrica de Tac foi linear na faixa de concentração de 1,0 a 40 µg/mL. A equação da reta de regressão, calculada pelo método dos mínimos quadrados, foi $Y = 33987X - 8709,4$ com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999 (figura 42). Os resultados dos parâmetros analíticos obtidos mostraram que, dentro das concentrações testadas, houve correlação altamente forte entre a área do pico e a concentração do fármaco.

O limite de detecção calculado foi de 0,11 µg/mL, correspondendo a menor quantidade do fármaco que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, e o limite de quantificação foi de 0,34 µg/mL (tabela 12), que é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017).

Figura 42 - Curva de calibração do Tac obtida por CLAE (n=3).

Fonte: Próprio autor.

Os valores encontrados para determinação do Tac, como o desvio padrão (DP) da inclinação da reta (58,62) e o DP da interseção da reta (1164,27), foram considerados adequados para um método analítico (tabela 12).

Tabela 12 - Dados obtidos através da curva de calibração do Tac por CLAE.

Parâmetros	Tacrolimus
Faixa de concentração (µg/mL)	1-40
Tempo de Retenção (min)	5,2
Inclinação da Reta	33987 (±58,62)
Interseção da Reta	8709,4 (±1164,27)
Limite de Detecção (µg/mL)	0,11
Limite de Quantificação (µg/mL)	0,34
Valor de R ²	0,9999

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Resultados expressos como média ± DP, n=3.

Para se determinar a eficiência de encapsulação (EE%), a quantificação do Tac foi realizada nos Tac-CLN após 24 h da sua produção. O teor do fármaco nos CLN, determinado através da equação da reta, foi de $2,02 \pm 0,013$ mg/mL, correspondendo a 101% e o Desvio

Padrão Relativo (DPR) foi de 0,64. Os valores estão dentro dos limites de 95% a 105% da quantidade declarada de Tac nos CLN (2,0 mg/mL) e o DPR foi inferior a 6%, para doseamento de fármacos em medicamentos de uso tópico, sendo estes resultados aceitáveis em protocolos de doseamento de fármacos (USP, 2009).

A eficiência de encapsulação do Tac na dispersão de CLN pelo método de ultrafiltração foi de $99,2\% \pm 0,06\%$ correspondendo a uma concentração de 1,98 mg/mL de Tac na formulação total ou 11,02 mg/g na base anidra.

Andrade et al., (2017) co-encapsularam Tac e clobetasol em CLN desenvolvido com ácido esteárico e ácido oleico, obtendo taxas de encapsulação de 97,2% para o Tac-CLN e 98,0% no Tac-CLN associado com clobetasol. Os autores atribuíram a alta capacidade de encapsulação do Tac nos CLN a sua elevada solubilidade no ácido esteárico e grande afinidade com a matriz lipídica. De acordo com os autores, um pré-requisito para se alcançar uma boa EE% é a elevada solubilidade do fármaco na fase lipídica, o que foi constatado neste trabalho um solubilidade aparente do Tac no OA em torno de 30,0 mg/mL, confirmando esta premissa.

Elevadas taxas de encapsulação do Tac também foram conseguidas usando monocaprilato de propilenoglicol e trimiristato de glicerila para formação de CLN modificados, alcançando taxa de aproximadamente 97,0% de encapsulação do Tac. Neste caso, eles modificaram a estrutura de cristalização do lipídeo sólido com um solubilizante lipofílico (monocaprilato de propilenoglicol), em baixas concentrações, formando nanogotas líquidas do fármaco nas imperfeições cristalinas do lipídeo sólido, acomodando o fármaco. Essa abordagem levou a formação de CLN modificados obtendo alta EE% (POPLE; SINGH, 2011).

Diferentemente dos dados obtidos, EE% de 50,0% foi conseguido quando CLN foram desenvolvidos com monoestearato de glicerol e dimetilglicol monometil éter, como lipídeos sólido e líquido, respectivamente, usando a técnica de ultrasonicação (NAM; JI; PARK, 2011).

Khan et al., (2016b) afirmam que as maiores concentrações de lipídeos e surfactantes influenciam na encapsulação do Tac usado em CLN para uso oral. Segundo os autores, a razão óbvia é que quanto maior o conteúdo lipídico, maior a incompatibilidade na composição lipídica binária (lipídeos sólido e líquido) de diferentes comprimentos de cadeia de ácidos graxos, resultando em mais espaço para a acomodação do fármaco nas imperfeições estruturais. Já a maior concentração de surfactante estaria facilitando o aumento da assimilação do fármaco dentro dos CLN, estabilizando a formulação.

Contrapondo a discussão elaborada por Khan et al., (2016b), o Tac apresenta baixa solubilidade geral em lipídeos sólidos, necessitando de elevadas quantidades (5,0% m/m ou mais) para solubilizar completamente o fármaco. Porém, concentrações lipídicas elevadas

também podem comprometer a estabilidade do sistema devido à agregação das nanopartículas (POPLE; SINGH, 2011).

5.5.5 Análise térmica

A DSC é o método mais comum usado para detectar quaisquer alterações na cristalinidade nos CLN em função da temperatura. A DSC baseia-se no fato de que diferentes modificações lipídicas possuem diferentes pontos de fusão, como foi feito para caracterizar o polimorfismo e o grau de cristalinidade nos CLN contendo Tac (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

Para obter CLN estável, é necessária a caracterização da cristalinidade e o grau de modificação lipídica. Além disso, o estado cristalino e a modificação lipídica podem influenciar a eficiência de encapsulação e a cinética de liberação (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

Diante dos resultados de DSC das formulações, pode-se verificar que o Tac apresentou um pico endotérmico em 131,49°C (tabela 13 e figura 43), indicando a fusão do fármaco, dados estes semelhantes aos da literatura, apenas com algumas variações.

Estudos de DSC com o Tac compararam os picos de fusão do fármaco com duas diferentes taxas de aquecimento, mostrando uma variação entre 116 e 134°C para a taxas de aquecimento de 2 a 40°C /minuto, respectivamente. Esta variação na fusão pode indicar a existência de Tac em diferentes formas hidratadas (DANTAS et al., 2018; POPLE; SINGH, 2011; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2013).

Tabela 13 - Resultados de DSC do Tac, MB, CLN e Tac-CLN.

Amostra	Tac	MB (60:40)	CLN	Tac-CLN
Entalpia de fusão (J.g ⁻¹)	-52,77	-96,66	-5,57	-65,70
Início (°C) (ponto médio)	121,81	35,76	36,83	35,29
Pico máximo (°C)	131,49	58,25	48,07	53,69
IC (%)	---	100	0,4	4,5

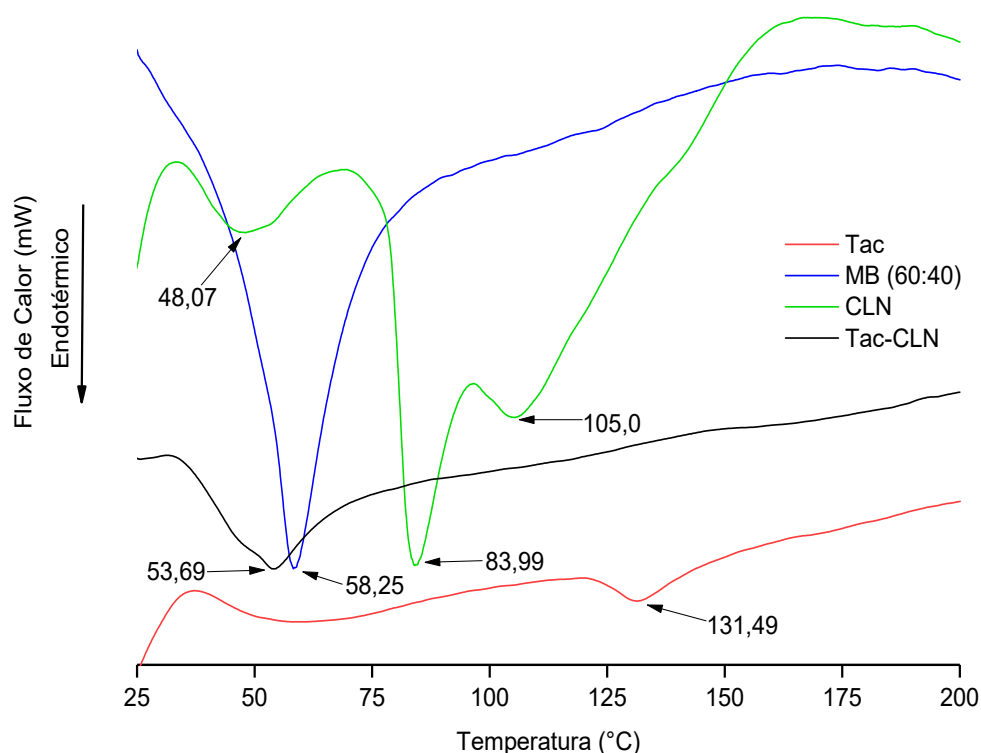
Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: Tac (tacrolimus), MB (mistura binária), IC (índice de cristalização).

A figura 43 mostra que os CLN apresentaram dois picos endotérmicos, onde a primeira transição ocorreu em 48,07°C, relatado como a fusão dos CLN, um pouco mais baixo em relação à MB, provavelmente pela presença dos surfactantes da formulação. Na segunda

transição existe um pico endotérmico grande e largo iniciando em 83,99°C, provavelmente indicando evaporação do solvente, principalmente água, pois os CLN não foram liofilizados neste estudo. O IC dos CLN foi de 0,4% (tabela 13), mostrando elevado grau de desordem da matriz lipídica, uma vez que a incorporação de óleo reduz as temperaturas de cristalização e fusão da matriz, resultando em uma menor entalpia de fusão (GOMES et al., 2014).

Figura 43 - Termogramas de DSC do Tac, MB, CLN e Tac-CLN.



Fonte: Próprio autor.

O termograma de DSC de Tac-CLN mostrou um pico endotérmico em 53,69°C e um IC de 4,5%, temperatura um pouco abaixo da fusão da MB. O pico endotérmico de fusão dos Tac-CLN (figura 43) mostrou completa ausência do pico de Tac, indicando que o fármaco foi completamente solubilizado dentro da matriz lipídica do nanossistema.

Quando o Tac foi incorporado nos CLN, a temperatura inicial de fusão (35,29°C) permaneceu praticamente inalterada quando comparada com a MB, no entanto houve uma diminuição na entalpia nos Tac-CLN, significando que há uma perda de cristalinidade dos lipídeos, porém apresentando ainda algum certo grau (4,5%).

De fato, a entalpia de fusão da MB diminuiu de -96,66 J/g para -65,70 J/g. Esses dados indicam uma recristalização mais lenta e uma maior perturbação na ordem dos cristais lipídicos, que podem influenciar na eficiência de encapsulação e gerar maior estabilidade do sistema e acomodação do fármaco no seu interior (GOMES et al., 2014).

De acordo com Dantas et al., (2018) a diminuição da temperatura de fusão e da entalpia nos CLN pode ser atribuída a uma maior desorganização do sistema. A incorporação de lipídeos líquidos promove mais imperfeições na matriz lipídica sólida do nanossistema lipídico, reduzindo a tendência de recristalizar o lipídio sólido nas suas formas mais estáveis termodinamicamente. Isso pode promover mais espaço para a acomodação do fármaco e impedir sua expulsão devido à transição polimórfica durante o armazenamento.

A MB revelou um pico em 58,25°C (figura 43 e tabela 13). Em comparação com a MB, o DSC do Tac-CLN mostra menor temperatura de início de fusão e valores de temperatura de pico (53,69°C), isso pode ser explicado pela presença do Tac na matriz lipídica, que também resulta em um aumento no números de defeitos na rede cristalina lipídica, causando uma diminuição no ponto de fusão da formulação (POPLE; SINGH, 2012).

O estado sólido do Tac-CLN foi confirmado para a temperatura da pele (32°C), uma vez que a temperatura de início e o pico de fusão estavam bem acima deste valor, assim como a ausência do pico endotérmico de fusão do Tac, indicando que houve solubilização ou conversão do fármaco da forma cristalina para a forma amorfa na matriz dos CLN.

A calorimetria exploratório diferencial (DSC) dá uma visão sobre a fusão e recristalização dos lipídeos sólidos nos CLN. A determinação da DSC usa o fato de que várias modificações lipídicas têm vários pontos de fusão e entalpias. O grau de cristalinidade dos CLN é calculado a partir da relação entre a entalpia dos CLN e a entalpia lipídica total, e que este diminui com o aumento da razão lipídica líquida nas partículas.

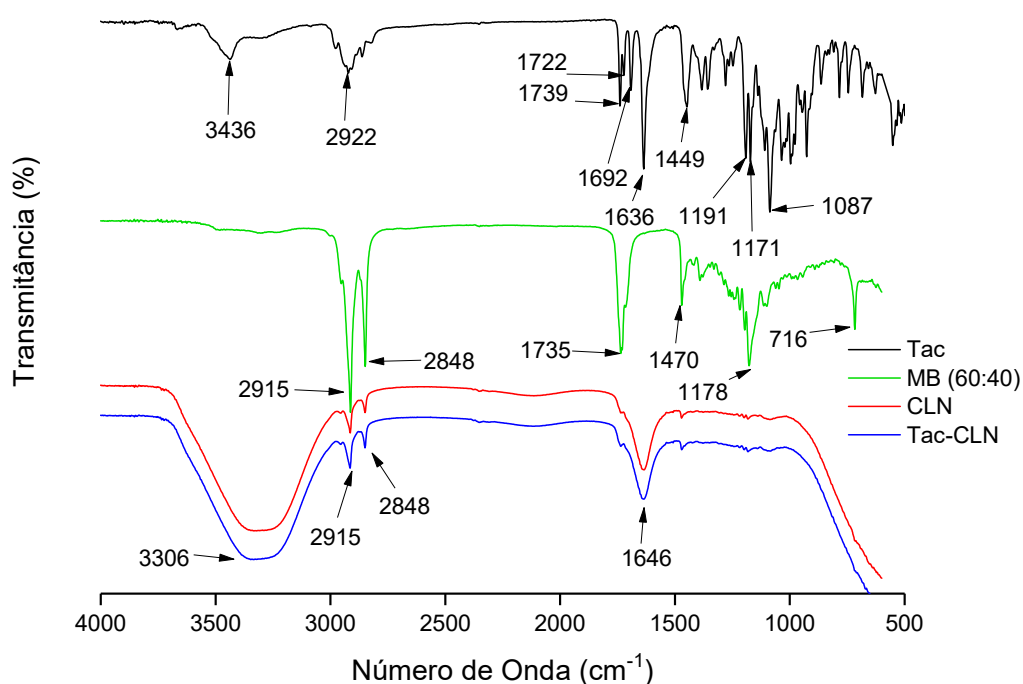
Esses resultados apresentam a evidência de que o óleo de andiroba é o principal fator que diminui a cristalinidade e aumenta a estrutura menos ordenada dos CLN. O declínio da entalpia e a redução do ponto de fusão dos lipídeos ocorrem em CLN que possuam menor tamanho, consequentemente uma maior área superficial e também maior número de emulsificantes (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

Então, podemos observar que óleo de andiroba levou a uma perturbação na ordem dos cristais do diestearato de glicerila, resultando em mais espaço para incluir as moléculas do Tac, o que corrobora com os dados de eficiência de encapsulação apresentando neste trabalho, que foi de $99,2\% \pm 0,06\%$ correspondendo a uma concentração de 1,98 mg/mL de Tac na formulação total ou 11,02 mg/g na base anidra.

5.5.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR do Tac, da MB entre OA e Pre (60:40) e das formulações de CLN e Tac-CLN foram estudadas para estimar quaisquer possíveis interações químicas entre os componentes dos nanossistemas (figura 44).

Figura 44 - Espectros de FTIR do Tac, MB, CLN e Tac-CLN.



Fonte: Próprio autor

O espectro de infravermelho do Tac mostrou duas banda de absorção largas e de média intensidade em 3436 cm^{-1} e 2922 cm^{-1} , devido a vibração de alongamento O-H (álcool) e uma vibração de alongamento C-H, respectivamente; Apresentou também uma ressonância amídica e cetônica ($\text{C}=\text{O}$) com vibrações de alongamento em 1739 cm^{-1} , 1722 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} e uma vibração de alongamento $\text{C}=\text{C}$ em 1636 cm^{-1} fina e forte; Vibração de alongamento $\text{C}=\text{O}$ (éster) em 1191 cm^{-1} e vibração de alongamento C-O-C (éter) em 1171 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} . Esses dados observados estão de acordo com os valores já relatados pela literatura (KHAN et al., 2016a; PATEL; PANCHAL; MEHTA, 2013; RAHMAN et al., 2014; SAVIĆ et al., 2017; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2013).

A MB selecionada, a partir do estudos de pré-formulação, apresentou fina e forte vibração de alongamento C-H em 2915 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} , indicando as características hidrofóbicas das longas cadeias alquílicas (KIM; PARK, 2011). Também foi registado pico de absorção fino e forte em 1735 cm^{-1} , indicando estiramento C=O. Uma deformação angular CH_2 em 1470 cm^{-1} , a deformação correspondente aos $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ de ésteres saturados entre 1178 cm^{-1} e também uma deformação angular de cadeia em $(\text{CH}_2)_n$ para $n > 3$ em 716 cm^{-1} (KUMBHAR; POKHARKAR, 2013; SENHORINI et al., 2012).

As formulações CLN e Tac-CLN apresentaram picos de vibração de alongamento largos e fortes bem nítidos em 3306 cm^{-1} e em 1646 cm^{-1} , como resultado de vibrações de alongamento O-H, devido a presença de água das formulações (figura 44). Também foram observados picos fracos e finos em 2915 cm^{-1} e em 2848 cm^{-1} , correspondendo aos seus constituintes lipídicos originários, devido aos grupos alcanos C-H do diestearato de glicerila (Pre). A presença do Tac na formulação não pode ser identificada, devido à encapsulação do fármaco na nanoestrutura lipídicas, o que dificulta a visualização dos seus picos.

Observações semelhantes foram encontradas por Savić et al., (2017) usando o Tac em microemulsões, onde as bandas de absorção mostradas nos espectros de FTIR apareceram nos mesmos números de comprimento de onda dos espectros das microemulsões contendo Tac, sem quaisquer novos picos ou potenciais desvios. Assim como também foi observado por Pople e Singh (2011), onde o Tac foi encapsulado em CLN modificado, utilizando os lipídeos diestearato de glicerila e o monocaprilato de propilenoglicol, evidenciando sobreposição dos picos dos materiais originários. Khan et al., (2016b) estudaram a encapsulação do Tac em CLN contendo berrenato de glicerila (Compritol® 888 ATO) para uso oral e verificaram que o FTIR da formulação placebo mostrou apenas os picos característicos dos excipientes e ausência de picos correspondendo ao fármaco.

Portanto, nos estudos de FTIR do Tac, MB, CLN e Tac-CLN não foram observadas interações químicas significativas ou alterações na estrutura das nanopartículas quando da incorporação do fármaco, estes resultados podem ser atribuídos a total encapsulação do Tac nos CLN.

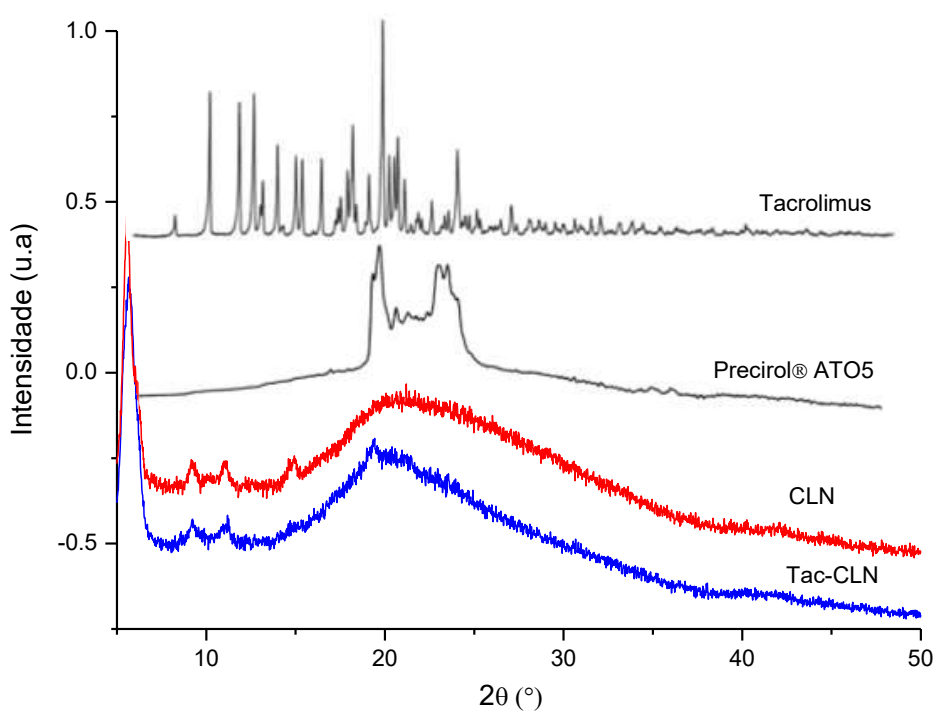
5.5.7 Difração de raios X

As medidas de DRX foram realizadas para avaliar o estado físico do núcleo lipídico e fornecer informações sobre o estado de cristalinidade do fármaco e das formulações de CLN. A figura 45 mostra os padrões de difração de raios X do tacrolimus (Tac), diestearato de

glicerila (Pre), carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN) e CLN contendo tacrolimus (Tac-CLN).

Os padrões de DRX do Tac foram obtidos da literatura e demonstra que o fármaco na sua forma monohidratada apresenta vários picos intensos e pontiagudos em 2θ igual a $7,3^\circ$, $13,5^\circ$, $15,4^\circ$, $21,1^\circ$, $21,3^\circ$ e $25,7^\circ$, característica da sua natureza cristalina. Estes picos foram usados como picos de diagnóstico para a identificação do Tac nos CLN (DANTAS et al., 2018; JOE et al., 2010; JUNG et al., 2016; RAHMAN et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2014; SRINARONG et al., 2012).

Figura 45 - Difratoograma de raios X do Tac, Pre, CLN e Tac-CLN



Fonte: Próprio autor e adaptado de SRINARONG et al., 2012 e ZHAO et al., 2014.

O padrão de DRX dos CLN apresentou três picos de menor intensidade em 2θ igual a 9° , 11° e 15° , já a DRX dos Tac-CLN mostrou ausência do pico em 15° e apresentou um pico largo e leve em 19° , devido à presença de um certo padrão cristalino do diestearato de glicerila (Precirol® ATO5). De acordo com a publicação de Dantas et al., (2018) picos de menor intensidade para DRX do ácido esteárico em 2θ igual a $6,5^\circ$, $8,6^\circ$, 11° , 15° , 20° , 30° e 36° foram observados, caracterizando uma fase cristalina para esse lipídeo.

Trabalhos semelhantes verificaram que o difratograma do Precirol® ATO5, apresentou um intenso e largo sinal em 2θ entre 17° e 25° . Segundo os autores, picos de menor intensidade apresentados em nanossistemas lipídicos no DRX são picos típicos de materiais cerosos e que sua intensidade nos difratogramas diminuem quando o lipídeo líquido é adicionado na matriz lipídica de CLN, o que contribui para a comprovação que os picos evidenciados tanto nos CLN como nos Tac-CLN é devido à presença de um certo grau de organização na estrutura cristalina do Precirol® ATO5 (DANTAS et al., 2018; KUMBHAR; POKHARKAR, 2013; ZHAO et al., 2014).

Em relação à encapsulação do Tac nos CLN, houve uma diminuição na intensidade do pico na região de 2θ igual a $21,1^\circ$ e $21,3^\circ$ quando o fármaco foi adicionado aos CLN. Isso sugere que a incorporação de tacrolimus induziu um distúrbio no sistema, reduzindo a organização estrutural do CLN. Não foi possível identificar os picos característicos do fármaco devido à sua baixa proporção nas nanopartículas lipídicas. Também é possível que o fármaco esteja na forma amorfa ou disperso homogeneamente na matriz lipídica das nanopartícula, sugerindo que o fármaco foi completamente solubilizado na matriz lipídica.

Então, observando concomitantemente os resultados de DSC e DRX, sugere-se uma possível interação física entre fármaco e lipídeos, sem nenhuma incompatibilidade entre os componentes da formulação ou expulsão do fármaco da nanoestrutura. A formação de CLN contendo matriz lipídica menos ordenada é muito importante, porque elas podem influenciar diretamente na quantidade de fármaco encapsulado e a estabilidade durante o armazenamento (AVERINA et al., 2011).

Assim, tomando o conjunto de ensaios no trabalho de caracterização dos CLN, foi confirmada a desorganização das estruturas cristalinas dos lipídeos e fármaco. Interações físicas entre o Tac e os lipídeos parecem estar presentes. Nenhuma interação molecular foi observada entre os componentes das formulações e modificações polimórficas não foram observadas após o processo de cristalização dos lipídeos. Portanto, estes sistemas lipídicos contendo OA podem ser o passo inicial para o desenvolvimento futuro de uma formulação estável e promissora contendo Tac para uso tópico.

5.5.8 Produção do biohidrogel híbrido ZBP-HEC

Dispersões de nanopartículas lipídicas geralmente são de baixa viscosidade e necessitam de um veículo convenientemente consistente para aderir na pele. Devido a baixa viscosidade do biohidrogel (ZBP), o que não é adequado para uso tópico, o uso de uma agente doador de

viscosidade foi utilizado. Através da incorporação de 1,0% da hidroxietilcelulose (HEC), um polímero semissintético derivado da celulose, assim como a adição de solubilizante (etanol), umectante (propilenoglicol) e conservantes (metilparabeno e propilparabeno), a viscosidade do gel foi incrementada.

A combinação polimérica resultante foi um biohidrogel híbrido (ZBP-HEC) de aspecto de gelatinoso, opaco e viscoso (figura 46). Esse biohidrogel híbrido permitiu a veiculação dos Tac-CLNT e sua posterior utilização nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Portanto, os hidrogéis podem ser vantajosamente combinados com Tac-CLN para fornecer uma estratégia de dupla encapsulação para a liberação controlada de fármacos lipofílicos. A encapsulação dupla fornece um nível adicional de controle sobre a liberação do fármaco, enquanto se beneficia das propriedades biológicas do hidrogel (DESFRANÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018).

Figura 46 - Dispersão polimérica entre o biohidrogel e a HEC a 1,0%.



Fonte: Próprio autor.

A veiculação do Tac-CLN na blenda polimérica do biohidrogel foi feita através de simples homogeneização na proporção de 1:1 entre Tac-CLN e o veículo (ZBP-HEC), obtendo assim uma formulação branca e com as características de um gel fluido, apresentando concentração de 1mg/g de Tac na formulação final de ZBP-HEC.

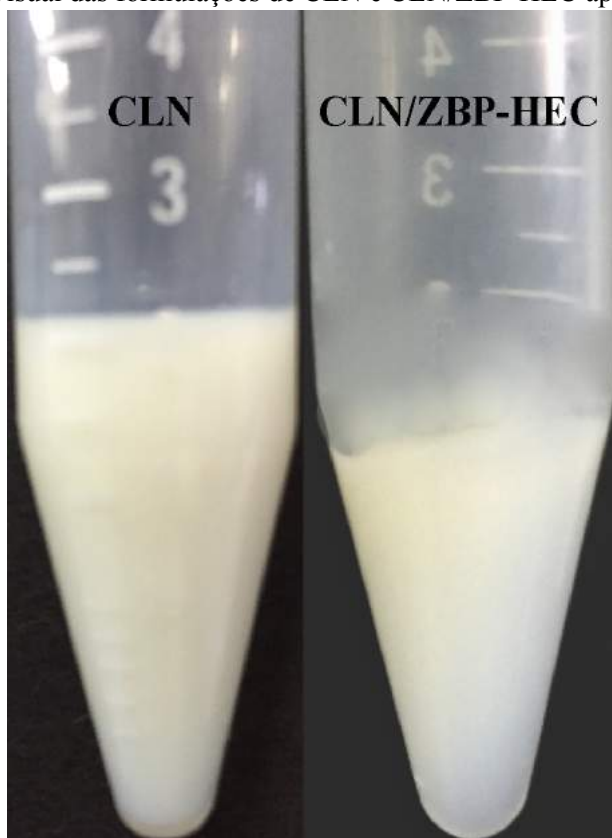
A incorporação dos Tac-CLN no ZBP-HEC partiu do fato que os polissacarídeos vêm despertando grande interesse nas pesquisas biomédicas, devido às suas propriedades:

naturalmente abundantes, biocompatíveis, mucoadesivos, biodegradáveis, alta afinidade com a água e permitem uma ampla gama de modificações químicas e estruturais, que podem ser realizados em condições brandas, o que é um grande trunfo para futuras aplicações médicas (DESFRAÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018).

5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As formulações de CLN e Tac-CLN/ZBP-HEC não apresentaram sinais de instabilidade no teste de centrifugação. Não foram observadas variações consideráveis no aspecto macroscópico e nem separação de fases, demonstrando boa estabilidade física (figura 47).

Figura 47 - Aspecto visual das formulações de CLN e CLN/ZBP-HEC após centrifugação (n=3).



Fonte: Próprio autor.

A força da gravidade atua sobre as nanopartículas podendo acarretando cremeação ou sedimentação, processos estes que aumentam as interações entre as nanoestruturas da fase dispersa, causando floculação, coalescência e posterior separação de fases. Este processo é tanto mais rápido quanto maior for a fragilidade do sistema (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001). Partículas dispersas em meio fluido, devido ao movimento browniano, podem se chocar

e, dependendo das forças de interação entre as partículas, atração e repulsão, e da natureza da sua superfície, estas colisões resultam em uma união permanente, ou em um afastamento que as manterão livres no meio (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). O teste de centrifugação é um estresse gravitacional que aumenta a colisão entre as partículas, permitindo prever de forma rápida a estabilidade de um CLN.

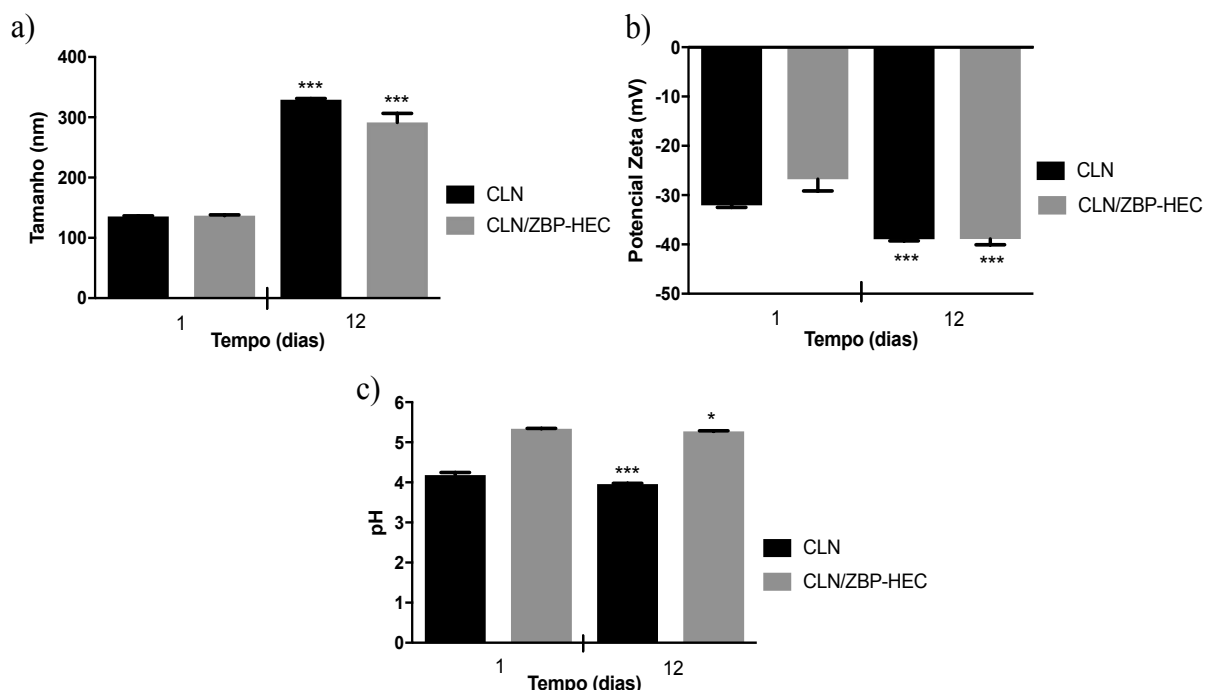
Estabilidade é a medida em que um produto retém, dentro dos limites especificados, ao longo de seu período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía no momento de sua embalagem (BAJAJ; SINGLA; SAKHUJA, 2012). O objetivo de um estudo de estabilidade é determinar o prazo de validade, ou seja, o período de tempo de armazenagem em uma condição estabelecida que um produto ainda atende às suas especificações estabelecidas (NANJWADE; KADAM; MANVI, 2013).

O estudo de estabilidade preliminar da formulação de CLN, através do ciclo gela/desgela, evidenciou uma alteração estatisticamente significativa no tamanho das partículas no decorrer de 12 dias, passando de $136,8 \pm 0,5$ nm para $291,5 \pm 6,2$ nm (figura 48a). A formulação CLN/ZBP-HEC foi de $136,8 \pm 1,4$ nm chegando a $291,5 \pm 15,14$ nm no final do estudo. Esses resultados sugerem que devido à temperatura relativamente elevada, pode ter havido uma ruptura das ligações de hidrogênio do tensoativos, levando a uma menor estabilidade (LI; GE, 2012). Porém, esses valores ainda estão dentro dos limites considerados apropriados para uso tópico, o que não invalida o prosseguimento do trabalho.

O segundo parâmetro analisado para o ciclo gela/desgela foi o potencial zeta (PZ), onde pode-se verificar que os CLN apresentavam um carga superficial de $-32,1 \pm 0,5$ mV, no início do experimento, passando a $-38,9 \pm 3,0$ mV. A formulação CLN/ZBP-HEC apresentou uma alteração de carga de superfície de $-22,5 \pm 1,9$ mV para $-38,9 \pm 0,5$ mV (figura 48b). Esta mudança no PZ pode ser devido a um aumento da hidrólise do PS80, assim como nas frações aniônicas do LE80. Este aumento significativo no PZ apresenta uma vantagem na estabilidade das nanopartículas, pois a agregação de partículas é menos provável ocorrer em nanossistemas com cargas superficiais $> |30 \text{ mV}|$ (NAM; JI; PARK, 2011).

Em relação ao valor do pH, formulações de CLN apresentaram valores de $4,2 \pm 0,04$ no tempo inicial (24 h) passando a $4,0 \pm 0,01$ após 12 dias de estudo, valor estatisticamente significativo. As formulações de CLN/ZBP-HEC apresentaram também valores estatisticamente significativo do pH de $5,3 \pm 0,01$ para $5,0 \pm 0,01$ após os ciclos gela/desgela (figura 48c). Alterações no valor do pH podem ser decorrentes de processos oxidativos dos componentes da formulação, como os óleos vegetais, que são passíveis de auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou a altas temperaturas (DAUDT et al., 2015).

Figura 48 - Resultados do teste gela/desgela de CLN e CLN/ZBP-HEC. a) Tamanho (nm), b) Potencial Zeta (mV) e c) pH. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, obtido pelo teste *t* de Student pareado (n=9).



Fonte: Próprio autor.

O valor do pH é outro importante parâmetro de monitoramento da estabilidade, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final.

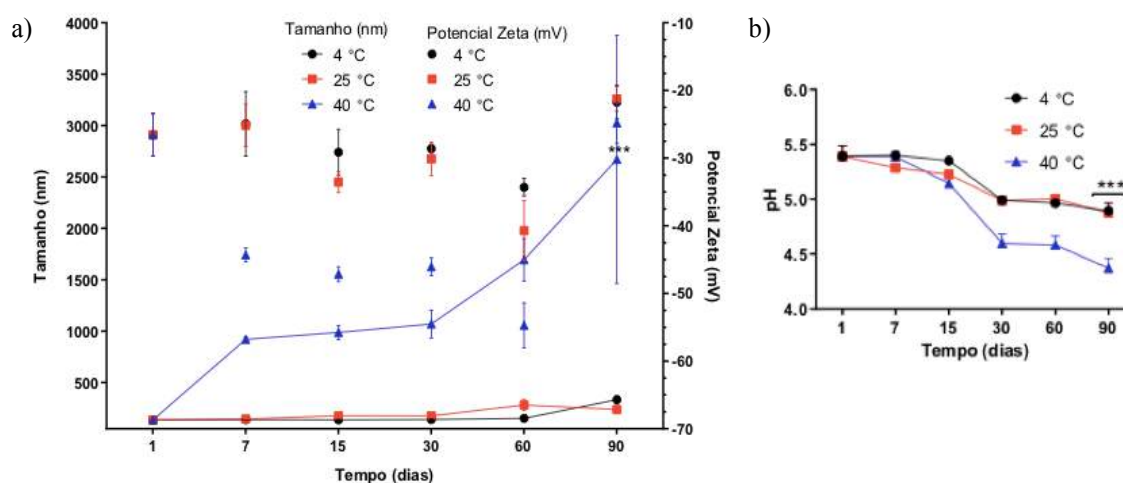
No caso de CLN formulados com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que originam AGL. Estes reduzem o valor de pH das formulações podendo, portanto, serem empregados como indicadores de estabilidade de nanossistemas lipídicos frente a diferentes condições de armazenagem. Além disso, o valor final de pH das nanopartículas pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface (SINKO, 2011).

As formulações destinadas ao uso tópico devem possuir valor de pH próximo ao da pele (4,5 e 7,5), a fim de evitar alterações fisiológicas que possam comprometer sua integridade (DAUDT et al., 2015).

Portanto, os valores de pH no estudo de estabilidade preliminar, através do ciclo gela-desgela demonstraram valores aceitáveis para uso tópico, o que permitiu a continuidade dos estudos de estabilidade, sem necessidade de ajustes nas formulações.

Os resultados dos testes de estabilidade acelerada para os CLN estão apresentados na figura 49.

Figura 49 - a) Valores de tamanho (nm), potencial zeta (mV) e b) pH das formulações de CLN durante 90 dias de armazenamento nas temperaturas de 4, 25 e 40°C. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (n=9).



Fonte: Próprio autor.

De acordo com os valores apurados nos ensaios, os CLN apresentaram um tamanho médio de $135,5 \pm 1,0$ nm no tempo zero de ensaio. Após 90 dias de experimentos, na temperatura de 4°C, o seu D não sofreu alterações significantes, passando para $137,2 \pm 1,4$ nm. Porém, na temperatura de armazenamento a 25°C, o D dos CLN apresentou uma alteração apenas após 90 dias, estabelecido em $180,5 \pm 1,2$ nm, valor estatisticamente significativo quando comparado com o tempo zero, porém considerado ainda adequado para o uso proposto.

As formulações que estavam armazenadas a 40°C, no final de 90 dias, apresentaram um D médio de $306,1 \pm 9,0$ nm, aumento estatisticamente significativo, porém este perfil observado já era previsto. Quando analisamos os dados de DSC, verifica-se que o início do ponto de fusão dos CLN acontece a 37°C, demonstrando que o sistema sofre alteração na sua estrutura e consequentemente desestabilização.

Vivek e colaboradores (2007) estudaram a estabilidade de NLS desenvolvidas com triestearato de glicerila carregada com olanzapina e obtiveram resultados semelhantes no aumento do D na temperatura de armazenamento de 40°C, passando de 198 nm para 908 nm em 120 dias de estudo. Resultados semelhantes foram observados também por Pople e Singh (2010), quando encapsularam o Tac em NLS preparados com trimiristato de glicerila. Os autores verificaram que o D aumentou drasticamente na temperatura de armazenamento de 40°C em um período de 3 meses, chegando a escala micrométrica.

O potencial zeta das formulações no estudo de estabilidade passou de $-32,07 \pm 0,4$ mV no tempo zero, para $-14,33 \pm 0,2$ mV após 90 dias armazenadas a 40°C, valores foram

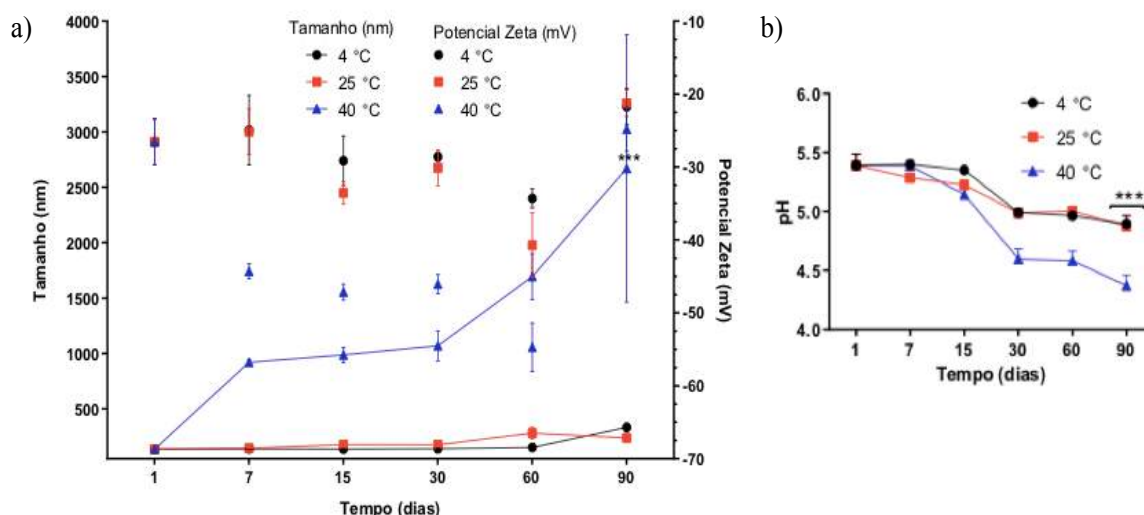
considerados estatisticamente significativos. As amostras armazenadas a 4°C e 25°C, durante todo o tempo de estudo de estabilidade não sofreram alterações significantes, permanecendo, portanto, estáveis neste parâmetro (figura 49a).

Os resultados de pH, apresentados na figura 49b, revelaram um pH inicial de $4,2 \pm 0,1$, permanecendo inalterado durante os 90 dias de estudo a 4°C. Porém, após 90 dias nas temperaturas de 25 e 40°C, as formulações apresentaram um pH de $3,7 \pm 0,03$ e $3,5 \pm 0,04$, respectivamente. Diminuição nos valores de pH em sistemas lipídicos é devido à formação de ácidos graxos livres como resultado da degradação hidrolítica do LE80 e do OA.

Levando em consideração o conjunto de dados obtidos no final dos estudos de estabilidade, podemos afirmar que os CLN permaneceram estáveis para o uso ao qual está sendo proposto e está dentro da faixa considerada mais adequada para os produtos de liberação tópica (DAUDT et al., 2015).

Após a veiculação dos CLN no ZBP-HEC (CLN/ZBP-HEC), a estabilidade também foi avaliada e os resultados do estudo, através do estresse térmico, para os parâmetros tamanho e potencial zeta estão apresentados na figura 50.

Figura 50 - a) Valores de tamanho (nm), potencial zeta (mV) e b) pH das formulações CLN/ZBP-HEC durante 90 dias de armazenamento nas temperaturas de 4, 25 e 40°C. * $p < 0,05$ vs tempo 1º dia, ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (n=9).



Fonte: Próprio autor.

No tempo zero, o D foi de $137,0 \pm 1,4$ nm com pequenas variações no decorrer do estudo nas temperaturas de 4 e 25°C, porém sem alterações estatisticamente significativas, sugerindo que há uma proteção do biohidrogel sobre os CLN. O tamanho da partícula foi aumentado apenas para cerca de 100 nm, e a distribuição de tamanho manteve-se como monomodal.

Contudo, verificamos que na temperatura de armazenamento a 40°C, nos primeiros dias de estudo, as partículas já passaram a tamanhos bem superiores aos iniciais, chegando a $2,7 \pm 1,0$ μm .

Conforme já foi dito, temperaturas acima de 37°C provocam fusão dos CLN e geram desestruturação dos nanossistemas sólidos lipídicos, consequentemente coalescência das gotículas e formação de estruturas bem maiores. Verificamos também que houve uma dificuldade na diluição das formulações armazenadas na temperatura de 40°C, devido à viscosidade elevada do ZBP-HEC pela evaporação da água que ficava condensada nas paredes do frasco e na superfície da formulação.

A relativa boa estabilidade dos CLN/ZBP-HEC nas temperaturas de 4 e 25°C, impedindo a agregação de partículas, pode ser atribuída à alta viscosidade do hidrogel, diminuindo o movimento browniano e, portanto, evitando o contato entre os CLN. Além disso, a matriz de hidrogel é formado por uma rede polimérica tridimensional compacta, que pode confinar o movimento browniano dos CLN incorporados, evitando a aproximação das nanopartículas (SUN; XIA, 2019).

Pople e Singh (2011) estudaram a estabilidade de CLN contendo Tac veiculado em hidrogel de carbopol® 980 e verificaram que os CLN também aumentaram de tamanho na temperatura de 25°C, passando de 59,53 nm para 155,53 nm em 3 meses de armazenamento. Observaram também que, na temperatura de 40°C, os CLN passaram para 916,1 nm no final de 12 meses, usando uma concentração lipídica de 2% que, segundo os autores, foi uma melhora significativa na estabilidade em comparação com relatórios anteriores, quando os mesmos usaram 5% de concentração lipídica, onde o tamanho das partículas excedeu 1 μm ao final de 6 meses.

De acordo com Freitas e Müller (1999), adicionalmente ao efeito da temperatura, a concentração lipídica também é considerada um fator significativo que afeta a estabilidade das nanopartículas lipídicas, o que podemos inferir para este trabalho, pois neste estudo foi utilizado uma concentração de lipídeos de 15%.

Em relação ao potencial zeta do CLN/ZBP-HEC, o valor inicial foi de $-26,5 \pm 3,1$ mV, apresentando pequenas variações ao longo do tempo de estudo nas temperaturas de 5 e 25°C (figura 50a). Variações estatisticamente significantes foram observadas na temperatura de 40°C, devido à desestruturação do sistema e oxidação da matriz lipídica, conforme já mencionado.

O pH das formulações CLN/ZBP-HEC foi de $5,4 \pm 0,1$ e manteve-se ao longo de 60 dias de armazenamento nas temperaturas de 4 e 25°C (figura 50b). Após 60 dias a 25°C

verificamos uma diminuição no pH para $4,9 \pm 0,1$, considerada estatisticamente significativa. Já na temperatura de 40°C foi verificado quedas acentuadas de pH a partir do 15º dia, chegando a $4,4 \pm 0,1$ no final do estudo. Esta variação de pH, é verificada em nanossistemas lipídicos a base de AGL, como resultado da degradação hidrolítica da lecitina e do OA, assim como a grande quantidade de água presente nos hidrogéis, o que favorece o processo de degradação hidrolítica, que pode levar a baixos índices de pH quando submetidos aos estudos de estabilidade.

Savic et al., (2017) estudaram a estabilidade de microemulsões contendo Tac estabilizadas com lecitina. Os autores observaram que o pH das formulações estocadas durante 1 ano a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentaram um decréscimo aproximado de 1,02 em todas as formulações estudadas. Os autores atribuíram essa redução do pH provavelmente à formação de AGL da lecitina e do triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico usados. Os pesquisadores também revelaram que os menores valores de pH ocorreram nas formulações que continha altas quantidades de água, resultados da degradação hidrolítica dos lipídeos.

Os dados de estabilidade, quando todos os parâmetros são observados e analisados simultaneamente, mostram que os CLN associados à matriz híbrida do biohidrogel tornaram-se mais estáveis ao longo do tempo, indicando que a matriz polimérica é capaz de impedir a fusão e também agregação das nanopartículas lipídicas. Portanto, como a instabilidade dos sistemas de liberação baseados em lipídeos está relacionada ao movimento browniano, este método de veiculação tem um grande potencial de ser aplicado em nanossistemas lipídicos para melhorar a sua estabilidade física (SUN; XIA, 2019).

5.7 PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE TAC-CLN

Formulações de CLN de OA e contendo tacrolimus foram desenvolvidas, veiculadas em biohidrogel, caracterizadas e sua estabilidade foi avaliada, permitido a continuidade do trabalho na avaliação da permeação e/ou penetração cutânea em modelo de orelha de porco, o que será demonstrado nos tópicos a seguir.

5.7.1 Seletividade do método de extração e doseamento do tacrolimus frente a interferentes da formulação e da matriz biológica

A pele da orelha de porco é considerada um sistema modelo de escolha *in vitro*, pois representa um substituto reconhecido para a pele humana em estudos sobre a absorção

percutânea. Histologicamente, o tecido da orelha de porco apresenta semelhanças na estrutura da pele humana, assim como, a estrutura folicular da pele da orelha de porco é muito semelhante à dos seres humanos, onde os seus infundíbulos se estendem profundamente na derme (BINDER et al., 2018; JACOBI et al., 2007; NOOR et al., 2017).

Então, o uso da pele de orelha de porco é extensivamente sendo utilizada para validar os estudos de penetração e/ou permeação cutânea nos trabalhos com nanossistemas para uso tópico. As áreas em bom estado das orelhas de porco, após todos os procedimentos de limpeza, retirada dos pelos e da gordura subcutânea, foram cortadas em forma de discos de aproximadamente 3,0 cm de diâmetro ou foram usadas imediatamente ou armazenadas em temperaturas a -20°C por até 30 dias.

Com o intuito de verificar se o método analítico selecionado era adequado para estudar a retenção do tacrolimus (Tac) na pele e se os interferentes das matrizes prejudicariam na detecção e quantificação do fármaco, a seletividade do método foi avaliada.

Os possíveis interferentes presentes nos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba (CLN), no biohidrogel híbrido (ZBP-HEC), na fita adesiva, no estrato córneo (EC) e pele remanescente (PR), assim como também a quantidade de Tac recuperado, foram analisados. Os resultados foram expressos em percentual de Tac recuperado e estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados dos testes de seletividade nas matrizes utilizadas nos ensaios *in vitro* de permeação/penetração cutânea (Tac=20 µg/mL).

Amostra	Média ± DP (µg/mL)	DPR (%)	Recuperação (%)
CLN	21,50 ± 0,49	2,29	107,50
ZBP-HEC	21,47 ± 0,49	2,30	101,29
Fita adesiva	22,03 ± 1,01	4,60	103,92
EC	21,71 ± 0,94	4,31	102,38
PR	19,59 ± 0,17	0,85	97,96

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: DP (desvio padrão), DPR (desvio padrão relativo), CLN (carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de andiroba), ZBP-HEC (biohidrogel híbrido), EC (estrato córneo) e PR (pele remanescente). Resultados expressos como média ± DP, n=6.

O emprego da fase móvel, constituída por acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,05% (80:20) e a acetonitrila como sistema extrator mostrou-se eficiente na recuperação do Tac na pele de orelha de porco. Os resultados estão dentro dos

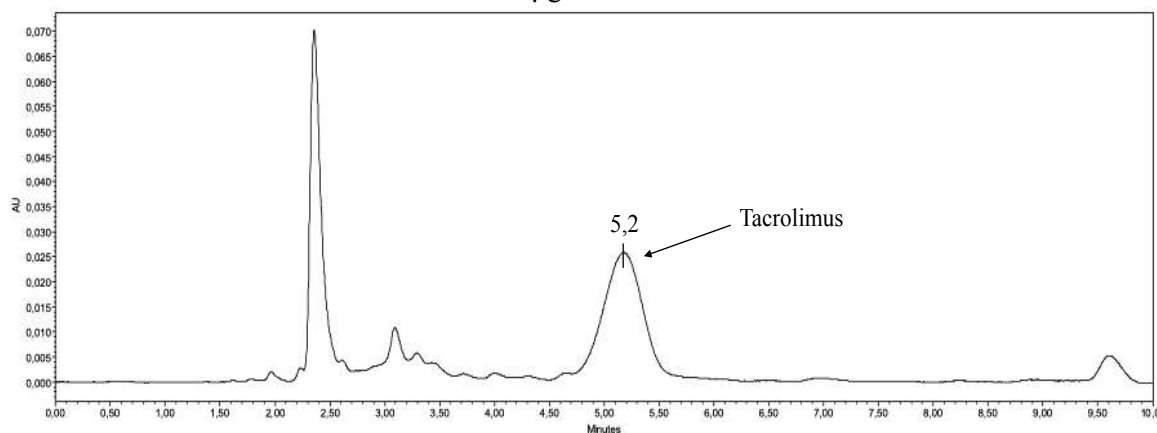
limites de quantificação estabelecidos, comprovando a ausência de interferentes relacionados à pele suína, fita adesiva, ZBP-HEC e CLN.

Os valores da recuperação estão diretamente relacionados com a capacidade do método de extrair o fármaco no modelo de biomembrana utilizado, a recuperação deve ser $100 \pm 10\%$, para garantir resultados adequados (OECD, 2004b).

Portanto, os resultados apresentados demonstram que não houve perda significativa nem degradação da substância analisada durante os procedimentos de retenção cutânea e extração, uma vez que o fármaco avaliado foi recuperado em quantidades superiores a 90%, confirmando que o método utilizado foi adequado e os resultados são confiáveis.

Avaliando o cromatograma do Tac no homogenato de pele, foi verificado que não há sobreposição de picos frente aos constituintes da pele (figura 51). O tempo de retenção do fármaco foi de aproximadamente 5,2 minutos, com boa definição e separação do pico cromatográfico, confirmando que o método é seletivo para a quantificação do Tac.

Figura 51 - Cromatograma do Tac após extração no homogenato de pele na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Próprio autor.

Tac foi extraído e doseado nas formulações, antes de serem utilizadas nos testes de penetração/permeação cutânea e de atividade farmacológica em modelo de psoríase, com boa repetibilidade e precisão, apresentando teores na faixa de 97,3 a 104,5 %, para as diversas formulações (tabela 15). Estes valores são considerados adequados para um método analítico, estando dentro dos limites preconizados pelas diretrizes do FDA de 80 a 120 % (ICH, 2005).

As concentrações descritas na tabela 15 correspondem a quantidade de tacrolimus após a diluição das formulações em acetonitrila, estando de acordo com a concentração do ponto central da curva analítica (20 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 15 - Doseamento do Tac nas formulações NCL utilizadas nos testes *in vitro*.

Amostra	Média $\pm$ DP ($\mu\text{g/g}$)	DPR (%)	Teor (%)
Tac-CLN	20,63 $\pm$ 0,45	2,16	103,16 $\pm$ 2,23
Tac-CLN/ZBP-HEC	20,44 $\pm$ 0,66	3,21	102,20 $\pm$ 3,28
Tac/ZBP-HEC	20,02 $\pm$ 0,05	0,30	100,10 $\pm$ 0,27

Fonte: Elaborada pelo autor.

Onde: DP (desvio padrão), DPR (desvio padrão relativo), Tac-CLN (tacrolimus encapsulado nos CLN de óleo de andiroba), Tac-CLN/ZBP-HEC (tacrolimus encapsulado nos CLN de óleo de andiroba e veiculados no biohidrogel híbrido), Tac/ZBP-HEC (tacrolimus veiculado no biohidrogel híbrido). Resultados expressos como média $\pm$ DP, n=6.

5.7.2 Avaliação da permeação/penetração e retenção cutânea *in vitro*

Experimentos *in vitro* foram realizados para se avaliar a permeação/penetração e a retenção cutânea do Tac nas diferentes camadas de pele, estrato córneo (EC), epiderme (EP) e derme (DE), após aplicação do Tac-CLN/ZBP-HEC, Tac-CLN, Tac/ZBP-HEC e Tarfic® (pomada comercial) no sistema automatizado de células de Franz, utilizando a pele de orelha de porco como membrana e a técnica de *tape stripping*.

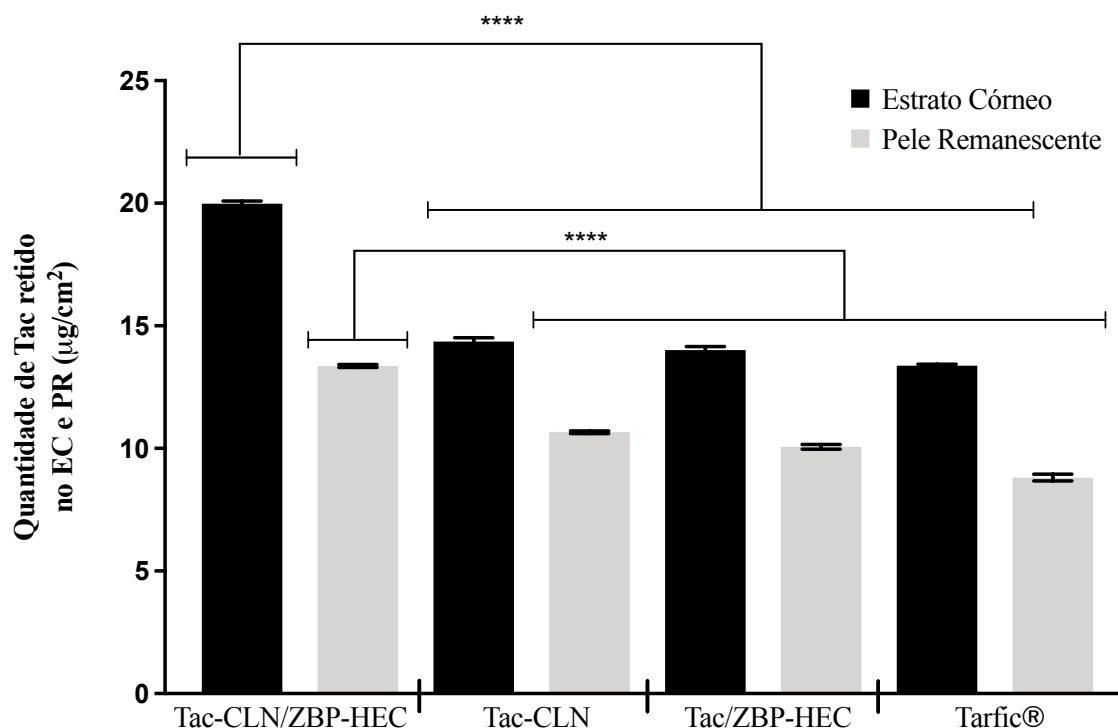
Ao final 24 h não foram detectadas por CLAE concentrações de Tac no fluido receptor, indicando que o Tac não foi capaz de permear a pele. Após separação da EP e DE, verificamos que as concentrações de Tac presentes nestas camadas da pele não apresentaram significância estatística, então resolvemos considerar as camadas EP e DE apenas como sendo PR.

Quando avaliamos separadamente as formulações (figura 52), verificamos que na amostra Tac-CLN/ZBP-HEC, em relação a dose aplicada (113,66 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele), a quantidade de Tac retida no EC foi de 19,98 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele. Este valor indica que 17,6% da quantidade aplicada de Tac ficou retida no EC. Já a quantidade de Tac retida na PR foi de 13,36 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele, isso corresponde a 11,75% da dose aplicada.

Avaliando agora a formulação Tac-CLN, obtivemos concentrações de Tac de 14,36 e 10,66 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele, correspondendo a 12,6 e 9,4% da dose aplicada que foram retidas no EC e na PR, respectivamente. Observando os valores na formulação Tac-/ZBP-HEC, concentrações de 14,01 e 10,66 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele, equivalentes a 12,3 e 8,9% da dose aplicada na pele foram retidas no EC e PR, respectivamente.

As concentrações de Tac que foram retidas no EC e na PR da pomada comercial (Tarfic®) foram de 13,38 e 8,81 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele, correspondendo a 11,8 e 7,7% da dose aplicada (113,66 $\mu\text{g/cm}^2$ de pele).

Figura 52 - Quantidade de Tac que penetrou no EC e na PR da pele de orelha de porco após 24 h. Valores apresentados obtidos pela média $\pm$ DP de cinco experimentos individuais para cada formulação (n=5). ****, $p < 0,0001$ em comparação com Tac-CNL, Tac/ZBP-HEC e Tarfic®. ANOVA 2 vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.



Fonte: Próprio autor.

Sendo assim, a formulação Tac-CLN/ZBP-HEC apresentou quantidades estatisticamente significantes maiores de Tac no EC ($p < 0,0001$) quando comparada com Tac-CLN, Tac/ZBP-HEC e Tarfic®. Avaliando Tac-CLN, Tac/ZBP-HEC e Tarfic®, ambas apresentaram retenção do fármaco muito semelhantes tanto no EC como na PR (figura 52). A razão para essa retenção superior no EC do Tac na formulação Tac-CLN/ZBP-HEC está no fato que os biohidrogéis são também usados como sistema de liberação de fármacos, pois oferecem uma matriz de suporte, liberando os CLN da rede polimérica e posteriormente o fármaco dos nanossistemas em tempos maiores para o EC.

Além disso, podemos observar também as características físico-químicas do Tac (massa molecular de 803,5 g/mol), estrutura de macrolídeo, lipofilicidade, juntamente com as características do EC (queratinócitos circundados por uma matriz lipídica), o que dificultam a passagem de moléculas pela pele, fazendo com que o Tac fique retido no EC (REHMAN; ZULFAKAR, 2014; YAMANAKA et al., 2014).

No caso do Tac livre no ZBP-HEC, fármaco altamente lipofílico, sua estabilização na matriz hidrofílica fica comprometida, podendo precipitar em forma de agregados ou ser

liberado de forma imediata e descontrolada, atingindo rapidamente seus limites no EC (DESFRAÇOIS; AUZÉLY; TEXIER, 2018; YAMANAKA et al., 2014).

Considerando o papel chave da fase oleosa dos CLN e dos tensoativos na sua interface, capaz de reter o composto ativo na matriz do sistema nanoparticulado, liberando-o de forma controlada até camadas mais profundas da pele; as propriedades lipofílicas da pomada comercial e o empacotamento do fármaco na matriz polimérica do biohidrogel, pode-se verificar que ambos sistemas (Tac-CLN, Tac/ZBP-HEC e Tarfic®) apresentaram uma retenção cutânea equiparados (PUGLIA et al., 2016).

Esses achados demonstraram que o acúmulo do Tac no EC pelas diversas formulações foi potencializado pelo biohidrogel, devido às suas propriedades de reservatório, onde uma concentração local elevada do ativo farmacêutico foi retida durante um longo período de tempo através de um mecanismo de liberação adequado controlado por difusão, intumescimento, químico ou com base em alguns estímulos ambientais, como a temperatura (NARAYANASWAMY; TORCHILIN, 2019).

Verifica-se também na figura 52 que a penetração do Tac na PR da formulação Tac-CLN/ZBP-HEC foi de aproximadamente 1,3 vezes maior do que Tac-CLN e Tac-ZBP-HEC, e 1,5 vezes superior que a pomada Tarfic®, concentrações estas estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). Isto sugere que os Tac-CLN quando veiculados no biohidrogel aumentam substancialmente as quantidades de Tac que penetrou do EC para a PR, em relação aos demais grupos.

Nam; Ji e Park (2011) investigaram a penetração de Tac incorporado em hidrogel de hidroxietilcelulose a 1% e observaram que a taxa de penetração era semelhante à pomada comercial Protopic®, indicando que os hidrogéis funcionam como suporte para fármacos, atuando também como sistema de liberação.

Pople e Singh (2012) estudaram as propriedades oclusivas do hidrogel a base de carbômero, incorporando nanopartículas contendo Tac, e verificaram que a formulação do Tac encapsulado em nanopartícula (NPTac) possuía propriedades oclusivas quase similares ao medicamento referência, historicamente reconhecido por suas propriedades oclusivas. Os autores relataram que as NPTac no hidrogel aumentou significativamente o fator de oclusão e que essa oclusividade reforçada do biohidrogel é vantajosa por não possuir a aderência indesejada ou oleosidade do veículo oclusivo da pomada convencional (POPLE; SINGH, 2012).

A taxa de penetração cutânea do Tac encapsulado nos CLN (Tac-CLN) foi também superior ($p < 0,001$) às formulações Tac-ZBP-HEC e a pomada Tarfic®, demonstrando que a

captação dérmica do Tac encapsulado no nanossistema lipídico pode resultar de um aumento do contato com a superfície dos CLN com os corneócitos, formando um filme coerente na superfície da pele após a aplicação e aumentando a oclusão, esta atribuída à adesividade das partículas lipídicas nanométricas diminuindo a evaporação da água da pele para a atmosfera e aumentando a hidratação cutânea, seguido por uma liberação rápida ou constante do ativo (NAM; JI; PARK, 2011).

Contrapondo as teorias sobre a potencialidade na penetração cutânea pelo aumento da hidratação, pesquisadores estudaram a penetração cutânea do Tac disperso em uma solução tampão e Tac encapsulado em CLN, e observaram que o Tac apresentou baixa retenção no EC ($1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) para ambos estudos. Os autores verificaram que o Tac não foi capaz de atingir a PR mesmo encapsulado em CLN. Segundo os autores, o Tac apresenta características físico-químicas indesejáveis (massa molar e $\log P$) para penetração cutânea. Além disso, a hidratação e interação das nanopartículas lipídicas com o EC não aumentou significativamente a penetração do Tac, como era esperado pelos autores (ANDRADE et al., 2017). Contudo, verificamos que as dispersões coloidais de Andrade et al., (2017) foram usadas diretamente sobre a pele, o que pode ter proporcionado a diminuição na retenção das formulações.

De acordo com Khurana e colaboradores (2013), as interações do gel contendo nanopartículas lipídicas com a superfície da pele também podem desempenhar um papel importante na determinação da distribuição de fármacos nas camadas da pele. Além disso, os nanossistemas desenvolvidos por Andrade e colaboradores tinham na sua composição o ácido oleico como lipídeo líquido, um ácido graxo insaturado de cadeia longa com 18 carbonos e uma dupla ligação, que poderia também contribuir com a penetração do fármaco (RUSTAN; DREVON, 2005).

Sugere-se então que as maiores taxas de penetração observadas neste estudo se devem também pelo uso do OA, rico em ácidos graxos poli-insaturados, o que favorece a uma maior desordenação na matriz lipídica dos nanocarreadores, menor índice de cristalização, facilitando o aprisionamento do fármaco nesta matriz e maior afinidade com a estrutura lipídica do EC. Como o EC é rico em lipídeos epidérmicos, os nanossistemas lipídicos ligam-se à superfície da pele o que permitiriam a troca lipídica entre o EC e os nanocarreadores.

De acordo com Sala et al., (2018), as propriedades coloidais e a liberação de CLN na pele dependem da sua composição lipídica, do fármaco encapsulado e do tamanho das partículas. Estudos de penetração em formulações farmacêuticas dérmicas revelaram que o grau de penetração depende da composição química da formulação, propriedades de formação de filme e hidratação da pele, mas também a interação dos lipídeos dos CLN e os surfactantes

presentes na interface com os lipídeos da pele, considerados como fatores que afetam o grau de penetração (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Kawadkar et al., (2013) desenvolveram CLN carregados com flurbiprofeno com óleo de coco, ácido esteárico e lecitina de soja, os quais permeavam as camadas profundas da pele e alcançavam a corrente sanguínea, demonstrando que os constituintes lipídicos dos nanossistemas influenciaram substancialmente na penetração na pele.

Um estudo sobre a permeação cutânea de CLN realizada por Teeranachaideekul et al., (2008) mostrou que nanopartículas lipídicas exibem uma penetração mais profunda até a camada dérmica quando o conteúdo de lipídeos líquidos é menor e, inversamente, um alto conteúdo em lipídeos líquidos limita a penetração na epiderme viável, o que pode ser explicado também pelas elevadas concentrações de Tac determinadas no EC neste trabalho, pois os CLN otimizados nesta pesquisa continham 15% de lipídeos, onde 9% foi composto pelo OA.

Song et al., (2014) formularam carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo voriconazol (VRC), um antifúngico triazólico de amplo espectro, que foram veiculados em hidrogel de Carbopol® 940 (VRC-CLN-Gel) para tratamento de infecções fúngicas de pele. Os autores conduziram um estudo de permeação cutânea *in vitro* em células de Franz utilizando pele da região dorsal de ratos. Os estudos de permeação e retenção de pele evidenciaram que o VRC apresentou rápida penetração na pele, após a aplicação, indicando que a permeação em estado estacionário foi alcançada rapidamente. A dispersão aquosa de CLN aumentou notavelmente a quantidade de VRC que permeava em 12 h: 1,9 vezes *versus* microemulsão (ME) e 4,0 vezes *versus* creme usual O/A. No caso do VRC-NLC-Gel, embora o valor do fluxo tenha diminuído 70% em comparação à dispersão de VRC-CLN, a preparação tópica teve uma alta taxa de quantidade de VRC permeada, juntamente com melhor adesividade sobre a pele. VRC-CLN-Gel mostrou uma maior quantidade de VRC permeada em 12 h que a ME e o creme contendo VRC, com uma permeação 1,7 e 2,8 vezes maior, respectivamente. Os autores categorizaram os efeitos da formulação na permeação cutânea de VRC em 2 variáveis: formulação de VRC-CLN e incorporação no hidrogel (VRC-CLN-Gel). A Taxa de Aprimoramento (TA) foi expressa como uma razão relativa dos valores de fluxo. VRC-CLN e VRC-CLN-Gel exibiram TA de 1,8 e 1,6 *versus* ME e ME-gel, respectivamente, demonstrando claramente que VRC-CLN e VRC-CLN-Gel eram superiores às formulações de ME e ME-gel para liberação de VRC na pele ($p < 0,05$). Os autores constataram que, além das propriedades de hidratação dos CLN pela oclusão do estrato córneo, a interação dos lipídeos e surfactantes dos CLN com os lipídeos da camada córnea são considerados fatores que afetam o grau de penetração. Por outro lado, a combinação com o hidrogel diminuiu levemente os valores de

fluxo das formulações, tanto nos CLN quanto nas ME. VRC-CLN-Gel e ME-gel exibiram valores de TA de 0,70 e 0,79 *versus* as de dispersões aquosas de CLN e ME, respectivamente, porque a incorporação de partículas lipídicas na matriz de hidrogel retardou a liberação de VRC. A quantidade de VRC ($\mu\text{g}/\text{mg}$) depositada no estrato córneo foi semelhante em todas as preparações e variou de 0,25 a 0,32 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Esse resultado sugere, segundo os autores, que o VRC foi prontamente ligado e acumulado na camada queratinizada do estrato córneo devido à sua alta lipofilicidade, com pouca influência das variáveis de formulação. Em contraste, em camadas mais profundas, a quantidade de fármaco depositado ($\mu\text{g}/\text{mg}$) usando VRC-CLN-gel foi notavelmente alta em comparação com as formulações de ME-Gel e creme. A quantidade de fármaco na epiderme e/ou derme após o tratamento com VRC-CLN-Gel foi 2,0, 2,1 e 3,7 vezes maior que ME, ME-Gel e creme, respectivamente. As magnitudes relativas da quantidade total de VRC retida em todo o tecido da pele entre as formulações foram as seguintes: VRC-NLC e VRC-NLC-Gel > VRC-ME > VRC-ME-Gel > CC. Os autores sugeriram que as nanopartículas lipídicas podem entrar em contato próximo com as junções de aglomerados e sulcos dos corneócitos, possivelmente favorecendo a acumulação de fármacos, independentemente da gelificação. Além disso, a alta afinidade de ligação dos lipídeos dos CLN às camadas lipofílicas da pele e outros tecidos contribuiu para o acúmulo de VRC na pele após a aplicação tópica de CLN-Gel e CLN.

Rajinikanth e Chellian (2016) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 5-fluorouracil (5-FU-CLN) e veicularam em um biohidrogel à base de Carbopol® 934 para a administração tópica. Os estudos de permeação *in vitro*, usando células de Franz e pele da região dorsal de camundongos, indicaram que os montantes cumulativos de 5-FU liberados do CLN-Gel e Gel 12 horas após a dosagem foram de $91,25 \pm 4,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $12,19 \pm 23,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Este resultado indicou claramente que a quantidade de 5-FU penetrante através da pele de rato a partir do CLN-Gel era significativamente ($p < 0,05$) muito maior (3,9 vezes maior) do que a quantidade de 5-FU permeada pelo 5-FU Gel em 12 horas de ensaio. A permeação aprimorada na pele do 5-FU-CLN veiculada no hidrogel, segundo os autores, deve-se principalmente ao aumento da área superficial e ao tamanho menor das partículas que interagem com corneócitos da pele, assim como as características superiores de oclusão da pele e hidratação mais eficaz do estrato córneo em comparação com outras formas de dosagem. Além disso, o Labrasol® (caprilcaproil polioxiglicerídeo), um surfactante não-iônico, presente nos CLN, pode afrouxar ou fluidizar das bicamadas lipídicas do estrato córneo, contribuindo assim para a permeação aprimorada da pele. Os estudos de retenção cutânea, onde as quantidades cumulativas de 5-FU retidas na epiderme e derme da pele de camundongos de

5-FU-NLC-Gel e 5-FU-Gel foram avaliadas, revelaram que 5-FU retida na epiderme na formulação 5-FU-NLC-Gel foi de $68,12 \pm 4,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, que é significativamente ($p < 0,05$) superior em comparação com $24,32 \pm 2,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ do 5-FU-Gel, ao final de 12 horas após a administração. A quantidade de 5-FU retida na derme de 5-FU-Gel foi muito menor ($21,82 \pm 2,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) em comparação com a formulação à base de 5-FU-NLC-Gel ($46,45 \pm 3,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), 12 horas após a administração. Os resultados dos estudos de retenção *in vivo* indicaram claramente que o potencial de penetração do hidrogel à base de 5-FU-NLC nas camadas da epiderme e da derme foi aumentado 2,78 e 2,09 vezes ($p < 0,05$) em relação a formulação de 5-FU no hidrogel, respectivamente. Nesta formulação de NLC, o fármaco estava bem disperso dentro da matriz lipídica e, além disso, o CLN foi incorporado ao gel de poli (ácido acrílico), que aderiu à pele, aumentando ainda mais o tempo de contato. Portanto, os autores concluíram que a retenção dérmica aumentada de 5-FU na formulação de CLN foi atribuída ao aumento do contato com corneócitos, retenção na pele e propriedades de liberação sustentada dos CLN. Além disso, o pequeno tamanho de partícula dos CLN permite um contato mais próximo com as junções superficiais dos corneócitos, favorecendo o acúmulo do fármaco por várias horas, o que poderia melhorar a hidratação do estrato córneo e aumentar a penetração do princípio ativo. Os autores fazem referência ainda a presença do lipídeo líquido usado na formulação de CLN, que é usado como intensificadores de absorção percutânea, que também poderiam facilitar a permeação do fármaco na pele. Além disso, os CLN foram formulados usando lipídeos sólidos à temperatura ambiente e sua incorporação no gel pode induzir mudanças estruturais das partículas devido à evaporação da água, resultando na transição da matriz lipídica para uma estrutura altamente ordenada, causando expulsão de fármacos. A partir do resultado, pode-se notar que os CLN podem desempenhar um papel importante no aumento da permeação de 5-FU na pele com liberação prolongada de fármacos, bem como no direcionamento do fármaco para a pele.

Zhang et al., (2017) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido alfa-lipóico (ALA) e um hidrogel a base de carbopol® 940 usado como veículo semissólido para aplicação cutânea. Os autores constataram que o comportamento de liberação de ALA-Gel e do ALA-CLN-Gel foi semelhante e pode ser atribuído à incorporação de ALA na matriz lipídica sólida e ao efeito retardador de liberação dos agentes gelificantes do biohidrogel. O hidrogel veiculando ALA-CLN teve um efeito de liberação sustentada de aproximadamente 85% do ALA em 30 horas. De acordo com os pesquisadores, isso foi devido provavelmente ao complicado processo de liberação, onde o ALA precisa ser liberado do CLN e depois liberado pela matriz de hidrogel. A quantidade de ALA depositada na pele e quantidade

permeada na circulação sistêmica foi monitorada após 12 h. Os autores verificaram que, ao contrário da solução de etanol contendo ALA e do hidrogel convencional contendo ALA, ALA-CLN-Gel e ALA-CLN reduziram significativamente a quantidade do fármaco permeado. No estudo, o teor de água da pele foi medido antes e após a aplicação do ALA-CLN-Gel. O teor de água da pele era de 33,5% antes da aplicação da amostra. Logo após a aplicação das formulações teste, o teor de água da pele aumentou consideravelmente até 48,6% e, posteriormente, diminuiu para 42,1% quando medido em 1 h. Mas os valores não foram muito alterados novamente durante o tempo de descanso até as 8 h. Os autores concluíram que o hidrogel aumentou ainda mais a viscosidade do CLN e teve um efeito de liberação sustentada do ALA maior que o CLN. Além disso, a base de hidrogel tem um efeito hidratante e pode aumentar o teor de água da pele, sendo esse efeito benéfico para produtos de uso tópico.

Mao et al., (2017) estudaram a penetração cutânea da curcumina (CUR), um fármaco antioxidante, encapsulada em nanopartículas catiônicas (CUR-NPs) para melhorar a capacidade de penetração do fármaco através do estrato córneo espessado, característica da pele psoriática. Para prolongar a retenção das nanopartículas na pele com psoríase após aplicação tópica, as CUR-NPs catiônicas foram incorporadas ao hidrogel de fibra de seda (SF) por meio de interações eletrostáticas para criar um novo hidrogel (CUR-NPs-gel). Os autores evidenciaram *in vitro* que a CUR a partir de CUR-NPs-gel exibiu uma liberação sustentada de CUR nos meios fisiológicos sem efeito *burst* evidente, enquanto a CUR livre foi prontamente liberada nas mesmas condições. Apenas 30% da CUR foi liberada do gel CUR-NPs após 72 h em PBS (pH 7,4), enquanto 49% da CUR foi liberada da CUR-NPs. Estes resultados indicaram que a adsorção de CUR-NPs no SF-gel poderia prolongar ainda mais a liberação de CUR. Os autores afirmaram que a liberação pontual de CUR a partir do CUR-NPs-gel pode ser devida ao fato de que as CUR-NPs veiculadas no SF-gel foram incorporadas nos poros do gel, dificultando assim a difusão das CUR-NPs incorporadas, o que, por sua vez, inibiu a liberação de CUR pelas nanopartículas. Para confirmar a capacidade de penetração na pele das NPs catiônicas e suas habilidades de liberação sustentada, quando veiculadas no SF-gel, os experimentos de penetração cutânea *in vivo*, por aplicações tópicas de CUR-gel e CUR-NPs-gel foram marcadas com o DAPI (4', 6'-diamino-2-fenil-indol). Este marcador fluorescente se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-timina. As formulações foram aplicadas nas costas de ratos durante 24 horas. Uma forte distribuição fluorescente foi apresentada dentro do estrato córneo da pele tratada com CUR-gel, enquanto uma fraca distribuição fluorescente foi observada nos tecidos mais profundos. Além disso, a maior parte da curcumina ainda era retida no estrato córneo em 48 horas. Embora a maior parte da curcumina da CUR-NPs-gel tenha sido

acumulada principalmente no estrato córneo na marca de 24 horas, uma distribuição fluorescente uniforme da curcumina do grupo CUR-NPs-gel foi observada nas diversas camadas da pele, incluindo o estrato córneo, epiderme e derme. Os autores constataram que foi observada uma capacidade aprimorada de permeação no córneo espesso da pele psoriática quando as CUR-NPs foram incorporados ao SF-gel. Segundo os pesquisadores, essas evidências podem significar que as CUR-NPs no hidrogel de SF foi primeiramente liberado do hidrogel e depois transportado a curcumina incorporada nas NPs através do estrato córneo. Os autores relataram que em estudos anteriores, as nanopartículas catiônicas exibiram fortes habilidades adesivas e penetrantes e que neste estudo, foi observada uma capacidade aprimorada de permeação de fármacos no córneo espesso da pele psoriática quando as CUR-NPs foram incorporadas ao SF-gel para administração tópica. Essas evidências, segundo os pesquisadores, podem significar que as CUR-NPs no hidrogel de SF foi primeiramente liberado do hidrogel e depois as NPs contendo a curcumina foram penetrando no estrato córneo.

Conforme descrito nos trabalhos apresentados, podemos inferir para este estudo que, em virtude dos efeitos de CLN nas propriedades de barreira da pele já estão bem estabelecidos, tem sido relatado que os CLN formam um filme oclusivo com afinidade pelo EC, que garante liberação do fármaco por um período prolongado de tempo. Este filme coerente de CLN reduz a perda de água transepidérmica e melhora a hidratação da pele, assim como há uma interação dos lipídeos e surfactantes dos CLN com os lipídeos do EC, promovendo aumento de penetração cutânea, contribuindo para uma maior distribuição destes sistemas nas camadas mais profundas da epiderme.

Aliado às particularidades dos nanossistemas, especificamente os carreadores lipídicos nanoestruturados, podemos sugerir que a presença do biohidrogel como suporte para os CLN melhora a adesividade sobre à pele, aumentando ainda mais o tempo de contato, promovendo também hidratação cutânea, devido a elevada quantidade de água presente nos hidrogéis, contribuindo com a penetração em camadas mais profundas da pele.

Então, fármacos como o tacrolimus, que apresenta problemas físico-químicos para uso tópico, difíceis de atravessar o EC e com elevado grau de irritação cutânea, podem ser encapsulados em CLN, especialmente desenvolvidos com óleos vegetais e veiculados em biohidrogel como matriz de suporte para aplicação na pele. Essa combinação de dupla encapsulação apresenta também vantagens superiores, fornecendo mais uma estratégia para a liberação controlada de fármacos lipofílicos. Porém, para comprovar essas propriedades de duplo encapsulamento do Tac, pesquisas poderão melhorar essas teorias usando técnicas adequadas e assim chegar a resultados mais consistentes.

Portanto, os biohidrogéis podem ser vantajosamente combinados com os CLN para fornecer uma estratégia de dupla encapsulação para a liberação controlada de fármacos lipofílicos, que fornecerá um nível adicional de controle sobre a liberação do fármaco, enquanto se beneficia das propriedades biológicas do biohidrogel. Se o CLN estiver físico-quimicamente estabilizado na rede de hidrogel, este sistema pode combinar as propriedades de ambas as classes de materiais e encontrar uma variedade de aplicações biomédicas.

6 CONCLUSÃO

- A composição de ácidos graxos da amostra de óleo de andiroba utilizado neste trabalho foi semelhante àquela descrita na literatura, com predominância de ácidos oleico e palmítico;
- Misturas binárias de óleo de andiroba e diestearato de glicerila mostraram modificação na cristalinidade à medida que aumentava a proporção de óleo de andiroba, conforme termogramas de DSC, aumentando as imperfeições lipídicas da matriz, consequentemente facilitando a formação de CLN e encapsulação do tacrolimus;
- Não foram observadas interações químicas nem incompatibilidades significativas entre o diestearato de glicerila e o óleo de andiroba, através da análise por FTIR das misturas binárias, o que favorece a formação de uma matriz lipídica estruturada e compartimentada para acomodar o tacrolimus;
- Os estudos de pré-formulação demonstraram que os CLN podem ser delineados com o óleo de andiroba, diestearato de glicerila e os tensoativos polisorbato 80 e Lipoid® E80, através da microfluidização, obtendo tamanhos e características desejáveis para nanossistemas de uso tópico;
- O planejamento experimental Box-Behnken demonstrou que a concentração dos surfactantes e do óleo de andiroba influenciaram notavelmente às respostas observadas para tamanho de partícula, com efeitos positivos na redução do diâmetro dos CLN;
- A caracterização dos Tac-CLN e das suas respectivas formulações através de DSC, FTIR e DRX mostraram elevado grau de desordem da matriz lipídica e total interação massa lipídica e fármaco;
- A MEV evidenciou a formação dos CLN, com formato esférico, superfície lisa, distribuição homogênea de tamanho, sem aglomeração de partículas e tamanho compatível com os determinados pela técnica de DLS;
- A técnica analítica foi adequada à quantificação do tacrolimus nas matrizes estudadas. A encapsulação do tacrolimus nos CLN foi alcançada com sucesso pela técnica de emulsificação e microfluidização;
- Formulações contendo CLN permaneceram estáveis nos estudos de estabilidade de triagem e acelerada, com um mínimo de variações, porém aceitáveis para o objetivo proposto;
- A retenção do tacrolimus tanto no estrato córneo quanto na pele remanescente foi significativa na formulação Tac-CLN/ZBP-HEC quando comparado as outras

formulações, demonstrando que além do nanossistema, o biohidrogel híbrido participa ativamente na penetração cutânea;

- Tac-CLN e Tac-CLN/ZBP-HEC aplicados sobre a pele de orelha de porco foram distribuídos uniformemente por todo o estrato córneo e a epiderme em 24 horas, corroborando com os estudos de penetração cutânea *in vitro* e provando a teoria dos nanossistemas lipídicos no transporte até camadas mais profundas da pele.

Avaliando todos os resultados deste trabalho, os CLN desenvolvidos com óleo de andiroba, contendo tacrolimus e veiculados em biohidrogel híbrido, representa uma formulação capaz de reter o fármaco na pele por mais tempo, representando uma forma de dupla encapsulação de ativos, configurando uma apresentação farmacêutica inovadora para uso em afecções cutâneas hiperproliferativas dos queratinócitos, como a psoríase.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, F. S.; ELKHESHEN, S. A.; MAHMOUD, A. A. AMMAR, H. O. Diflucortolone valerate loaded solid lipid nanoparticles as a semisolid topical delivery system. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2016.
- ABDEL-SALAM, F. S.; MAHMOUD, A. A.; AMMAR, H. O.; ELKHESHEN, S. A. Nanostructured lipid carriers as semisolid topical delivery formulations for diflucortolone valerate. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 1, p. 41-55, 2017.
- ABDELBARY, A. A.; ABOUGHALY, M. H. H. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis: application of box-behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 485, n. 1-2, p. 235-243, 2015.
- ABDELGAWAD, R.; MAHA, N.; MOFTA, N.; HAMZA, M. Phospholipid membrane tubulation using ceramide doping “cerosomes”: characterization and clinical application in psoriasis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 258-268, 2017.
- AGARWAL, R.; KATARE, O. P.; VYAS, S. P. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. **International journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1-2, p. 43-52, 2001.
- AGRAWAL, U.; GUPTA, M.; VYAS, S. P. Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 33-39, 2015.
- AGRAWAL, U.; MEHRA, N. K.; GUPTA, U.; JAIN, N. K. Hyperbranched dendritic nano-carriers for topical delivery of dithranol. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 5, p. 497-506, 2013.
- AGRAWAL, Y.; PETKAR, K. C.; SAWANT, K. K. Development, evaluation and clinical studies of acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 93-102, 2010.
- ALAM, M. S.; ALI, M. S.; ALAM, N.; SIDDIQUI, M. R.; SHAMIM, M.; SAFHI, M. M. In vivo study of clobetasol propionate loaded nanoemulsion for topical application in psoriasis and atopic dermatitis. **Drug Invention Today**, v. 8, p. 8-12, 2013.
- ALBUQUERQUE, P. C. V. C.; SANTOS, S. M.; AGUIAR, J. L. A.; FILHO, N. P.; MELLO, R. J. V.; COSTA, M. L. C. R.; OLBERTZ, C. M. C. A.; ALMEIDA, T. M. S.; SANTOS, A. H. S.; SILVA, J. C. Comparative macroscopic study of osteochondral defects produced in femurs of rabbits repaired with biopolymer gel cane sugar. **Brazilian Orthopaedic Journal**, v. 46, n. 5, p. 577-584, 2011.
- ALI, M. F. M.; SALAH, M.; RAFEA, M.; SALEH, N. Liposomal methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: preparation, characterization and laser targeting. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 12, p. 166-174, 2008.

ALI, S. M.; AHMAD, A.; SHEIKH, S.; AHMAD, M. U.; RANE, R. C.; KALE, P.; PAITHANKAR, M.; SAPTARISHI, D.; SEHGAL, A.; MAHESHWARI, K.; AHMAD, I. Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil free nanosomal formulation of immunosuppressant tacrolimus: pharmacokinetics, safety, and tolerability in rodents and humans. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 325-330, 2010.

ALI, R.; FARAH, A.; BINKHATHLAN, Z. Development and characterization of methoxy poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PEO-b-PCL) micelles as vehicles for the solubilization and delivery of tacrolimus. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 258-265, 2017.

AL-MAHALLAWI, A. M.; ABDELBARY, A. A.; ABURAHMA, M. H. Investigating the potential of employing bilosomes as a novel vesicular carrier for transdermal delivery of tenoxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, p. 329-340, 2015.

ALVAREZ-FIGUEROA, M.; BLANCO-MENDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **International Journal Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 57-65, 2001.

AMARAL, L. F. G.; FIERRO, I. M. Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 716-722, 2013.

AMARJI, B.; GARG, N. K.; SINGH, B.; KATARE, O. P. Microemulsions mediated effective delivery of methotrexate hydrogel: more than a tour de force in psoriasis therapeutics. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 2, p. 147-160, 2016.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; FERNANDES DA SILVA, M. F. G.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 542-547, 2006.

ANDRADE, F. F. SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P. ROCHA-FILHO, P. A. Influence of PEG-12 dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystal. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, n. 3, p. 211-218, 2007.

ANDRADE, L. M.; SILVA, L. A. D.; KRAWCZYK-SANTOS, A. P.; AMORIM, I. C. S. M.; ROCHA, P. B. R.; LIMA, E. M.; ANJOS, J. L. V.; ALONSO, A.; MARRETO, R. N.; TAVEIRA, S. F. Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 142-149, 2017.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica - formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000, p. 397-438.

ANTONIO, J. R.; ANTÔNIO, C. R.; CARDEAL, I. L. S.; BALLAVENUTO, J. M. A.; OLIVEIRA, J. R. Nanotechnology in dermatology. **Brazilian Annals of Dermatology**, v. 89, n. 1, p. 126-36, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2. Ed. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avaliação+de+Segurança+de+Produtos+Cosméticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>. Acesso em: 27 jun. 2019.

ANVISA. Ministério da Saúde. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC No 166, de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. v. 2017, p. 1-22, 2017.

ARAÚJO, J.; GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L. SOUTO, E. B. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetone-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 168-176, 2010.

ARIMA, H.; YUNOMAE, K.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl- β -cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 547-555, 2001.

AVASATTHI, V.; PAWAR, H.; DORA, C. P.; BANSOD, P.; GILL, M. S.; SURESH, S. A novel nanogel formulation of methotrexate for topical treatment of psoriasis: optimization, in vitro and in vivo evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 5, p. 554-562, 2016.

AVERINA, E. S.; MÜLLER, R. H.; POPOV, D. V.; RADNAEVA, L. D. Physical and chemical stability of nanostructured lipid drug carriers (NLC) based on natural lipids from Baikal region (Siberia, Russia). **Pharmazie**, v. 66, n. 5, p. 348-356, 2011.

AZIZ, D. E.; ABDELBAR, A. A.; ELASSASY, A. I. Investigating superiority of novel bilosomes over niosomes in the transdermal delivery of diacerein: in vitro characterization, ex vivo permeation and in vivo skin deposition study. **Journal of Liposome Research**, v. 29, n. 1, p. 73-85, 2019.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 02, n. 3, p. 129-138, 2012.

BALDISSERA, M. D.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; ZIMMERMANN, C. E. P.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; RECH, V. C.; TONIN, A. A.; GIONGO, J. L.; MATTOS, C. B.; KOESTER, L.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.

BANDE, M. S.; AGARWAL, S. Validated spectrophotometric method for determination of tacrolimus in marketed formulation. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 317-321, 2012.

BARBIERI, J. S.; WANAT, K.; SEYKORA, J. **Skin: basic structure and function**. In: MC MANUS, L. M.; MITCHELL, R. N. Pathobiology of human disease. 1. ed. Massachusetts: Academic Press, 2014. p. 1134-1144.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671-4677, 2012.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; SANTOS, J. M.; SANTOS, F. N.; BARCIA, M. T.; LOURENÇO, C. C.; SALVADOR, M. J.; GODOY, H. T.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. **Food Research International**, v. 64, p. 472-481, 2014.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.

BELOQUI, A.; DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; ISLA, A.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; SOLINÍS, M. Á. Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 144-154, 2017.

BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. A.; DELGADO, A.; ÉVORA, C.; ISLA, A.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A. Fate of nanostructured lipid carriers (NLCs) following the oral route: design, pharmacokinetics and biodistribution. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, p. 1-8, 2014.

BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. Á.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A. ALMEIDA, A. J.; PRÉAT, V. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143-161, 2016.

BENSON, A.; BARRETT, T.; SPARBERG, M.; BUCHMAN, A. L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, n. 1, p. 7-12, 2008.

BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 85-108.

BERGER, T. G. DUVIC, M.; VAN VOORHEES, A. S.; FRIEDEN, I. J. The use of topical calcineurin inhibitors in dermatology: Safety concerns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. 818-823, 2006.

BERTH-JONES, J. Psoriasis. **Medicine**, v. 41, n. 6, p. 334-340, 2013.

BESSAR, H.; VENDITTI, I.; BENASSI, L.; VASCHIERI, C.; AZZONI, P.; PELLACANI, G.; MAGNONI, C.; BOTTI, E.; CASAGRANDE, V.; FEDERICI, M.; COSTANZO, A.; FONTANA, L.; TESTA, G.; FARAG, F.; ALI, S.; VITTORIA, M.; FRATODDI, I. Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 141-147, 2016.

BHADRA, A.; KARMAKAR, G.; NAHAK, P.; CHETTRI, P.; ROY, B.; GUHA, P.; MANDAL, A. K.; NATH, R. K.; PANDA, A. K. Impact of detergents on the physicochemical behavior of itraconazole loaded nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 516, p. 63-71, 2017.

BHATIA, A.; SINGH, B.; WADHWA, S.; RAZA, K.; KATARE, O. P. Novel phospholipid-based topical formulations of tamoxifen: evaluation for antipsoriatic activity using mouse-tail model. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 2, p. 160-163, 2014.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BIDDLE, K.; AHMED, S. H. Tacrolimus. **Practical Diabetes**, v. 36, n. 1, p. 33-35, 2019.

BIKKAD, M. L.; NATHANI, A. H.; MANDLIK, S. K.; SHROTRIYA, S. N.; RANPISE, N. S. Halobetasol propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. **Journal Liposome Research**, v. 24, n. 2, p. 113-123, 2014.

BINDER, L.; KULOVITS, E. M.; PETZ, R.; RUTHOFER, J.; BAURECHT, D.; KLANG, V.; VALENTA, C. Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy - a comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 130, n. 5, p. 214-223, 2018.

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

BOROWSKA, K.; LASKOWSKA, B.; MAGON, A.; MYSLIWIEC, B.; PYDA, M.; WOLOWIEC, S. P. Dendrimers as solubilizers and hosts for 8-methoxypsoralene enabling transdermal diffusion of the guest. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n. 1-2, p. 185-189, 2010.

BOROWSKA, K.; WOLOWIEC, S.; RUBAJ, A.; GLOWNIAK, K.; SIENIAWSKA, E.; RADEJ, S. Effect of polyamidoamine dendrimer g3 and g4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene - in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1-2, p. 280-283, 2012.

BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. H. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v. 9, p. 165-169, 2000.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P. MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BRACKE, S.; CARRETERO, M.; GUERRERO-ASPIZUA, S.; DESMET, E.; ILLERA, N.; NAVARRO, M. Targeted silencing of DEFB4 in a bioengineered skin-humanized mouse model for psoriasis: development of siRNA SECosome-based novel therapies. **Experimental Dermatology**, v. 23, p. 199-201, 2014.

BRUSCHI, M. L.; DA SILVA, J. B.; ROSSETO, H. C. Photodynamic therapy of psoriasis using photosensitizers of vegetable origin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 20, p. 2279-2291, 2019.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 379-402, 2007.

CABRAL, E. C.; CRUZ, G. F.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; GONÇALVES, L. V.; LEAL, R. V. P.; SILVA, R. C. F.; SILVA, J. C. T.; BARATA, LAURO E. S.; CUNHA, V. S.; FRANÇA, L. F.; DARODA, R. J.; SÁ, G. F.; EBERLIN, M. N. Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. **Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1385-1391, 2013.

CERQUEIRA-COUTINHO, C.; CAMPO, V. E. B.; ROSSI, A. L.; VEIGA, V. F.; HOLANDINO, C.; FREITAS, Z. M. F.; RICCI-JÚNIOR, E.; MANSUR, C. R. E.; SANTOS, E. P.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Comparing in vivo biodistribution with radiolabeling and Franz cell permeation assay to validate the efficacy of both methodologies in the evaluation of nanoemulsions: a safety approach. **Nanotechnology**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2016.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHAI, Q.; JIAO, Y.; YU, X. Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them. **Gels**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2017.

CHAMCHEU, J. C.; SIDDIQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; ESNAULT, S.; BHARALI, D. J.; BABATUNDE, A. S.; ADAME, S. MASSEY, R. J.; WOOD, G. S.; LONGLEY, B. J.; MOUSA, S. A.; MUKHTAR, H. Chitosan-based nanoformulated (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates human keratinocyte-induced responses and alleviates imiquimod-induced murine psoriasiform dermatitis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4189-4206, 2018.

CHAMUNDEESWARI, M.; JESLIN, J.; VERMA, M. L. Nanocarriers for drug delivery applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 2, p. 849-865, 2018.

CHANDRASHEKHAR, V.; MAREPALLY, S. Nanotechnology in psoriasis. **Prayogik Rasayan**, v. 1, p. 48-53, 2017.

CHEN, C. C.; TSAI, T. H.; HUANG, Z. R.; FANG, J. Y. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 474-82, 2010.

CHEN, M.; KUMAR, S.; ANSELMO, A. C.; GUPTA, V.; SLEE, D. H.; MU- RASKI, J. A.; MITRAGOTRI, S. Topical delivery of cyclosporine a into the skin using space-peptide. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 190-197, 2015.

CHEN, S.; LIU, W.; WAN, J.; CHENG, X.; GU, C.; ZHOU, H.; CHEN, S.; ZHAO, X.; TANG, Y.; YANG, X. Preparation of coenzyme Q10 nanostructured lipid carriers for epidermal targeting with high-pressure microfluidics technique. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 1, p. 20-28, 2013.

CHI, C. C.; WANG, S. H. Efficacy and cost-efficacy of biologic therapies for moderate to severe psoriasis: A meta-analysis and cost-efficacy analysis using the intention-to-treat principle. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

CHOI, Y. M.; ADELZADEH, L.; WU, J. J. Photodynamic therapy for psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 26, n. 3, p. 202-207, 2015.

CHOMOUCKA, J.; DRBOHLAVOVA, J.; HUSKA, D.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HUBALEK, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research**, v. 62, p. 144-149, 2010.

CHOUGULE, M.; PADHI, B.; MISRA, A. Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 675-688, 2007.

COELHO JUNIOR, E. R.; COSTA, L. O. B. F.; ALENCAR, A. V.; BARBOSA, A. P. G.; PINTO, F. C. M.; AGUIAR, J. L. A. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 194-198, 2015.

CONACHER, M.; ALEXANDER, J.; BREWER, J. M. Oral immunisation with peptide and protein antigens by formulation in lipid vesicles incorporating bile salts (bilosomes). **Vaccine**, n. 19, p. 2965-2974, 2001.

CONGA, M.; WUC, Z.; XU, X.; YIN, J.; LI, H.; ZHUANG, B.; WANG, C.; ZHAO, X. Novel oleyl amine-modified polymannuronic acid micelle loading tacrolimus for therapy of allergic conjunctivitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 862-873, 2017.

CONRAD, C.; GILLIET, M. Psoriasis: from pathogenesis to targeted therapies. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 1, p. 102-113, 2018.

COSTA-SILVA, J. H.; LIMA, C. R.; SILVA, E. J. R.; ARAÚJO, A. V.; FRAGA, M. C. C. A. RIBEIRO e RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 495-500, 2008.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO e RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 122-126, 2007.

CZAJKOWSKA-KOSNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 1, p. 156-166, 2019.

DADWAL, A.; MISHRA, N.; NARANG, R. K. Novel topical nanocarriers for treatment of psoriasis: an overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 3934-3950, 2018.

DANE, K. Y.; NEMBRINI, C.; TOMEI, A. A.; EBY, J. K.; O'NEIL, C. P.; VELLUTO, D.; SWARTZ, M. A.; INVERARDI, L.; HUBBELL, J. A. Nano-sized drug-loaded micelles deliver payload to lymph node immune cells and prolong allograft survival. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 154-160, 2011.

DANNERT, C.; STOKKE, B. T.; DIAS, R. S. Nanoparticle-hydrogel composites: from molecular interactions to macroscopic behavior. **Polymers**, v. 11, n. 2, p. 1-35, 2019.

DANTAS, I. L.; BASTOS, K. T. S.; MACHADO, M.; GALVÃO, J. G.; LIMA, A. D.; GONSALVES, J. K. M. C.; ALMEIDA, E. D. P.; ARAÚJO, A. A. S.; MENESES, C. T.; SARMENTO, V. H. V.; NUNES, R. S. LIRA, A. A. M. Influence of stearic acid and beeswax as solid lipid matrix of lipid nanoparticles containing tacrolimus. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 132, n. 3, p. 1557-1566, 2018.

DAUDÉN, E.; CASTAÑEDA, S.; SUÁREZ, C.; GARCÍA-CAMPAYO, J.; BLASCO, A. J.; AGUILAR, M. D.; FERRÁNDIZ, C.; PUIG, L.; SÁNCHEZ-CARAZO, J. L. Integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 103, supl. 1, p. 1-64, 2012.

DAUDT, R. M.; BACK, P. I.; CARDOZO, N. S. M.; MARCZAK, L. D. F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 573-580, 2015.

DESFRAŇÇOIS, C.; AUZÉLY, R.; TEXIER, I. Lipid nanoparticles and their hydrogel composites for drug delivery: a review. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 118, p. 1-24, 2018.

DEY, P.; BANERJEE, S.; MANDAL, S.; CHATTOPADHYAY, P. Design and evaluation of anti-fibrosis drug engineered resealed erythrocytes for targeted delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, p. 997-1007, 2019.

DHEER, D.; JYOTI; GUPTA, P. N.; SHANKAR, R. Tacrolimus: an updated review on delivering strategies for multifarious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 217-227, 2018.

DILNAWAZ, F.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 538, p. 263-278, 2018.

DIVYA, G.; PANONNUMMAL, R.; GUPTA, S.; JAYAKUMAR, R.; SABITHA, M. Acitretin and aloe-emodin loaded chitin nanogel for the treatment of psoriasis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 97-109, 2016.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 2, p. 165-176, 2009.

DOPPALAPUDI, S.; JAIN, A.; CHOPRA, D. K.; KHAN, W. Psoralen loaded liposomal nanocarriers for improved skin penetration and efficacy of topical PUVA in psoriasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 515-529, 2017.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

ECKMANN, D. M.; COMPOSTO, R. J.; TSOURKAS, A.; MUZYKANTOV, V. R. Nanogel carrier design for targeted drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 46, p. 8085-8097, 2014.

EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 671, n. 1-2, p. 113-131, 1995.

EL-NABARAWI, M. A.; SHAMMA, R. N.; FAROUK, F.; NASRALLA, S. M. Bilosomes as a novel carrier for the cutaneous delivery for dapsone as a potential treatment of acne: preparation, characterization and in vivo skin deposition assay. **Journal of Liposome Research**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2019.

ERDÖ, F.; HASHIMOTO, N.; KARVALY, G.; NAKAMICHI, N.; KATO, Y. Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. **A review. Journal of Controlled Release**, v. 233, p. 147-161, 2016.

ERDOGAN, M.; WRIGHT, J. R. MCALISTER, V. C. Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. **British Journal of dermatology**, v. 146, n. 6, p. 964-967, 2002.

ESHITA, Y.; UEMOTO, S.; TABATA, Y.; SAKAMOTO, S.; EGAWA, H.; HASHIDA, T.; INUI, K.; TANAKA, K. Drug delivery system using microspheres that contain tacrolimus in porcine small bowel transplantation. **Transplant International**, v. 17, n. 12, p. 841-847, 2005.

FANG, C. L.; AL-SUWAYEH, S. A.; FANG, J. Y. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.

FANG, J. Y.; FANG, C. L.; LIU, C. H.; SU, Y. H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633-640, 2008.

FANG, Y. P.; HUANG, Y. B.; WU, P. C.; TSAI, Y. H. Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 391-398, 2009.

FDA. Food and Drug Administration. **Drug products, including biological products, that contain nanomaterials - guidance for industry**, n. 12, p. 1-25, 2017.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry nonsterile semisolid dosage forms**, n. 5, p. 19-24, 1997.

FELETAR, M.; FOLEY, P.; BROWN, M. Developments in psoriasis and psoriatic arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 47-54, 2008.

- FERRARIS, F. K.; MORET, K. H.; FIGUEIREDO, A. B. C.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 82-93, 2012.
- FERRARIS, F. K.; RODRIGUES, R.; SILVA, V. P.; FIGUEIREDO, R.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **International Immunopharmacology**, v.11, n. 1, p.1-11, 2011.
- FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. D. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazonica**, v. 32, p. 647-661, 2002.
- FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. *Carapa guianensis* AUBL. e *Carapa procera* D. C. **Manual de Sementes da Amazônia**, v. 1, p. 1-8, 2003.
- FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; SOUZA, T. P.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, E. E.; SOARES, L. A. L. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1383-1390, 2010.
- FISCH, S. T. V.; FERRAZ, I. D. K.; RODRIGUES, W. A. Distinguishing *Carapa guianensis* Aubl. from *Carapa procera* D. C. (Meliaceae) by morphology of young seedlings. **Acta Amazonica**, v. 24, n. 3-4, p. 193-200, 1995.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, 732 p.
- FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. **Cosmetics & Toiletries**, v. 18, p. 7-10, 2006.
- FRANZ, T. J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. **Current Problems in Dermatology**, v. 7, p. 58-68, 1978.
- FREITAS, C.; MULLER, R. H. Stability de termination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 1, p. 59-71, 1999.
- FRIEDRICH, R. B.; DIMER, F. A.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Nanoencapsulation of tacrolimus in lipid-core nanocapsules showed similar immunosuppressive activity after oral and intraperitoneal administrations. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1599-1609, 2014.
- GABRIEL, D.; MUGNIER, T.; COURTHION, H.; KRANIDIOTI, K.; KARAGIANNI, N.; DENIS, M. C. LAPTEVA, M. KALIA, Y.; MÖLLER, M.; GURNY, R. Improved topical delivery of tacrolimus: a novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 16-24, 2016.
- GAO, S.; SUN, J.; FU, D.; ZHAO, H.; LAN, M.; GAO, F. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of tacrolimus-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded

albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 410-416, 2012.

GARCÊS, A.; AMARAL, M. H.; LOBO, J. M. S.; SILVA, A. C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 159-167, 2018.

GARG, T.; RATH, G; GOYAL, A. K. Nanotechnological approaches for the effective management of psoriasis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1374-1382, 2016.

GARG, V.; JAIN, G. K.; NIRMAL, J.; KOHLI, K. Topical tacrolimus nanoemulsion, a promising therapeutic approach for uveitis. **Medical Hypotheses**, v. 81, p. 901-904, 2013.

GARG, V.; SURI, R.; JAIN, G. K.; KOHLI, K. Proglycosomes: A novel nano-vesicle for ocular delivery of tacrolimus. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 40-47, 2017.

GEUSENS, B.; LAMBERT, J.; DE SMEDT, S. C.; BUYENS, K.; SANDERS, N. N.; VAN GELE, M. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 3, p. 214-220, 2009.

GHARBAVI, M.; AMANI, J.; KHEIRI-MANJILI, H.; DANAFAR, H.; SHARAFI, A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, p. 1-15, 2018.

GOEBEL, A. S. B.; NEUBERT, R. H. H.; WOHLRAB, J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1, p. 159-168, 2011.

GOMES, M. J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1231-1242, 2014.

GONZALEZ-MIRA, E; NIKOLIĆ, S.; CALPENA, A. C.; EGEA, M. A.; SOUTO, E. B.; GARCÍA, M. L. Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC-based hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 707-725, 2012.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, n. 10, p. 285-308, 2018.

GREB, J. E.; GOLDMINZ, A. M.; ELDER, J. T.; LEBWOHL, M. G.; GLADMAN, D. D.; WU, J. J.; MEHTA, N. N.; FINLAY, A. Y.; GOTTLIEB, A. B. Psoriasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1-17, 2016.

GUENTHER, L.; LYNDE, C.; POULIN, Y. Off-label use of topical calcineurin inhibitors in dermatologic disorders. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 23, n. 4S, p. 27S-34S, 2019.

GÜNGÖR, S.; REZIGUE, M. Nanocarriers mediated topical drug delivery for psoriasis treatment. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 454-468, 2017.

GUPTA, A. K.; ADAMIYAK, A.; CHOW, M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. **Journal of the European Academy Dermatology and Venerology**, v. 16, p. 100-114, 2002.

GUPTA, M.; AGRAWAL, U.; VYAS, S. P. Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 7, p. 783-804, 2012.

GUPTA, R.; GUPTA, M.; MANGAL, S.; AGRAWAL, U.; VYAS, S. P. Capsaicin-loaded vesicular systems designed for enhancing localized delivery for psoriasis therapy. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, p. 825-834, 2016.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMAN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTH, K.; SCHÄFER-KORTING, M.; FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; RAVENZWAAY, B. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2015.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HAMIDI, M.; TAJERZADEH, H. Carrier erythrocytes: an overview. **Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 9-20, 2003.

HAMMER, M. L.; JOHNS, E. A. Tapping an Amazônian plethora: four medicinal plants of Marajó island, Pará (Brazil). **Journal of ethnopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 53-65, 1993.

HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; LIU, H.; XU, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 210-216, 2008.

HARRISON, I. P.; SPADA, F. Hydrogels for atopic dermatitis and wound management: a superior drug delivery vehicle. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p 1-13, 2108.

HASHIM, I. I. A.; EL-MAGD, N. F. A.; EL-SHEAKH, A. R.; HAMED, M. F.; EL-GAWAD, A. E. G. H. A. Pivotal role of acitretin nanovesicular gel for effective treatment of psoriasis: ex vivo-in vivo evaluation study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1059-1079, 2018.

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7-8, p. 262-271, 2013.

HENRIQUES, M. D. G.; PENIDO, C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 6, p. 850-856, 2014.

HIRLEKAR, R.; PATEL, P.; DAND, N.; KADAM, V. Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 63-70, 2008.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007, 2008.

HOSSAIN, M. S.; MIAH, M. T.; KHAN, M. Z. H.; KHONDKER, L.; HASAN, M. R. Efficacy of topical tacrolimus 0.1% and clobetasol propionate 0.05% in the treatment of alopecia areata. **Journal of Pakistan Association of Dermatology**, v. 25, p. 197-201, 2015.

HUANG, Z.; HUA, S.; YANG, Y.; FANG, J. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 9, p. 1094-1102, 2008.

ICH. **ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology**. International Conference on Harmonization, v. 1994, n. 11, p. 17, 2005.

IQBAL, M. A.; SHADAB, M.; SAHNI, J. K.; BABOOTA, S.; DANG, S.; ALI, J. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813-830, 2012.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2007.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E. G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JAIN, A.; DOPPALAPUDI, S.; DOMB, A. J. KHAN, W. Tacrolimus and curcumin co-loaded liposphere gel: synergistic combination towards management of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 132-145, 2016.

JAIN, S.; ADDAN, R.; KUSHWAH, V.; HARDE, H.; MAHAJAN, R. R. Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid-based tacrolimus loaded nanoformulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 96-104, 2019.

JAISWAL, P.; GIDWANI, B.; VYAS, A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, p. 27-40, 2016.

JAKOBSEN, M.; STENDERUP, K.; ROSADA, C.; MOLDT, B.; KAMP, S.; DAM, T. N.; JENSEN, T. G.; MIKKELSEN, J. G. Amelioration of psoriasis by anti-TNF α RNAi in the xenograft transplantation model. **Molecular Therapy**, v.17, n. 10, p. 1743-1753, 2009.

JESUS, F. L. M.; ALMEIDA, F. B.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; KELMANN, R. G.; CARVALHO, J. C. T.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M.; SOLANS, C.; FERNANDES, C. P. Preparation of a nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) oil by a low-energy/solvent-free method and evaluation of its preliminary residual larvicidal activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

JOE, J. H.; LEE, W. M.; PARK, Y. J.; JOE, K. H.; OH, D. H.; SEO, Y. G.; WOO, J. S.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 161-166, 2010.

JOS, S.; KRISHNAKUMAR, K.; DINESHKUMAR, B. Emulsomes drug delivery: a review. **International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 13-17, 2019.

JUNG, H. J.; AHN, H. I.; PARK, J. Y.; HO, M. J.; LEE, D. R.; CHO, H. R.; PARK, J. S.; CHOI, Y. S.; KANG, M. J. Improved oral absorption of tacrolimus by a solid dispersion with hypromellose and sodium lauryl sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 282-287, 2016.

KAKADIA, P. G.; CONWAY, B. R. Solid Lipid Nanoparticles: A potential approach for dermal drug delivery. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 2, n. 5, p. 1-7, 2014.

KALAYCIOGLU, G. D.; AYDOGAN, N. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 510, p. 77-86, 2016.

KARADZOVSKA, D.; BROOKS, J. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Predicting skin permeability from complex vehicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 265-277, 2013.

KAUR, A.; KATIYAR, S. S.; KUSHWAH, V. JAIN, S. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 1473-1482, 2017.

KAUR, N.; SHARMA, K.; BEDI, N. Topical nanostructured lipid carrier-based hydrogel of mometasone furoate for the treatment of psoriasis. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 133-143, 2018.

KAUR, S.; NAUTYAL, U.; SINGH, R.; SINGH, S.; DEVI, A. Nanostructure lipid carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. **Asian Pacific Journal Health Science**, v. 2, n. 2, p. 76-93, 2015.

KAWADKAR, J.; PATHAK, A.; KISHORE, R.; CHAUHAN, M. K. Formulation, characterization and in vitro-in vivo evaluation of flurbiprofen-loaded nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 4, p. 569-578, 2013.

KENTISH, S.; WOOSTER, T. J.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KHAN, S.; GANGULI, M.; ADITYA, A.; KHAN, S.; BABOOTA, S.; ALI, J. Improved in vivo performance and immunomodulatory effect of novel omega-3 fatty acid-based tacrolimus nanostructured lipid carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 138-149, 2019.

KHAN, S.; SHAHARYAR, M.; FAZIL, M.; HASSAN, M. Q.; BABOOTA, S.; ALI, J. Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery - optimization of production and characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 277-288, 2016a.

KHAN, S.; SHAHARYAR, M.; FAZIL, M.; HASSAN, M. Q.; BABOOTA, S.; ALI, J. Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery-in vivo bioavailability enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 109, p. 149-157, 2016b.

KHEZRI, K.; SAEEDI, M.; DIZAJ, S. M. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1499-1505, 2018.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n. 4, p. 598-613, 2018.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Development and characterization of a novel controlled release drug delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam. **Life Sciences**, v. 93, n. 21, p. 763-722, 2013.

KIM, H.; KIM, J. T.; BARUA, S.; YOO, S. Y.; HONG, S. C.; LEE, K. B.; LEE, J. Seeking better topical delivery technologies of moisturizing agents for enhanced skin moisturization. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 17-31, 2017.

KIM, K. S.; PARK, S. J. Influence of glyceryl palmitostearate on release behaviors of hydroxypropyl cellulose microcapsules containing indomethacin by W/O emulsion. **Macromolecular Research**, v. 19, n. 11, p. 1121-1126, 2011.

KLANG, V.; SCHWARZ, J. C.; LENOBEL, B.; NADJ, M.; AUBÖCK, J.; WOLTZ, M.; VALENTA, C. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 3, p. 604-614, 2012.

KLIMAS, C. A.; KAINER, K. A.; DE OLIVEIRA, W. L. H. The economic value of sustainable seed and timber harvests of multi-use species: an example using *Carapa guianensis*. **Forest Ecology and Management**, v. 268, p. 81-91, 2012.

KNUDSEN, N. O.; JORGENSEN, L.; HANSEN, J.; VERMEHREN, C.; FROKJAER, S.; FOGED, C. Targeting of liposome-associated calcipotriol to the skin: effect of liposomal membrane fluidity and skin barrier integrity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 478-485, 2011.

KNUDSEN, N. O.; RONHOLT, S.; SALTE, R. D.; JORGENSEN, L.; THORMANN, T.; BASSE, L. H.; HANSEN, J.; FROKJAER, S.; FOGED, C. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 532-539, 2012.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. 30-36, 2005.

KULKARNI, C. V.; MOINUDDIN, Z.; PATIL-SEN, Y.; LITTLEFIELD, R.; HOOD, M. Lipid-hydrogel films for sustained drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 416-421, 2015.

KUMAR, R.; DOGRA, S.; AMARJI, B.; SINGH, B.; SHARMA, S. K.; VINAY, K.; MAHAJAN, R.; KATARE, O. P. Efficacy of cyclosporine in mild to moderate stable plaque psoriasis a randomized clinical trial. **JAMA Dermatology**, v. 152, n. 7, p. 807-814, 2016.

KUMBHAR, D. D.; POKHARKAR, V. B. Engineering of a nanostructured lipid carrier for the poorly water-soluble drug, bicalutamide: physicochemical investigations. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 416, p. 32-42, 2013.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. vol. II, p. 509-517.

LADEMAN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C.; WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J. W. The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 317-323, 2009.

LAKSHMI, P. K.; DEVI, G. S.; BHASKARAN, S.; SACCHIDANAND, S. Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: Phase I and phase II studies. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, n. 3, p. 157-161, 2007.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. A pH-sensitive microsphere system for the colon delivery of tacrolimus containing nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 337-346, 2005.

LANDY, J.; WARE, M.; PEAKE, S. T. C.; HUSSEIN, M.; NG, S. C.; LINDSAY, J. O.; HART, A. L. Oral tacrolimus as maintenance therapy for refractory ulcerative colitis - an analysis of outcomes in two London tertiary centres. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, p. e516-e521, 2013.

LAPTEVA, M.; MONDON, K.; MÖLLER, M.; GURNY, R.; KALIA, Y. N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 9, p. 2989-3001, 2014a.

LAPTEVA, M.; SANTER, V.; MONDON, K.; PATMANIDIS, I.; CHIRIANO, G.; SCAPOZZA, L.; GURNY, R.; MÖLLER, M.; KALIA, Y. N. Targeted cutaneous delivery of ciclosporin using micellar nanocarriers and the possible role of intercluster regions as molecular transport pathways. **Journal of Control Release**, v. 196, p. 9-18, 2014b.

LEE, D. R.; HO, M. J.; JUNG, H. J.; CHO, H. R.; PARK, J. S.; YOON, S. H.; CHOI, Y. S.; CHOI, Y. W.; OH, C. H.; KANG, M. J. Enhanced dissolution and oral absorption of tacrolimus by supersaturable self-emulsifying drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1109-1117, 2016.

LEE, L.; HANCOCKS, R.; NOBLE, I.; NORTON, I. T. Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: a study on droplet break-up. **Journal of Food Engineering**, v. 131, p. 33-37, 2014.

LEE, L.; NORTON, I. T. Comparing droplet breakup for a high-pressure valve homogeniser and a microfluidizer for the potential production of food-grade nanoemulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 158-163, 2013.

LEE, S. G.; KANG, J. B.; KIM, S. R.; KIM, C. J.; YEOM, D. W.; YOON, H. Y.; KWAK, S. S.; CHOI, Y. W. Enhanced topical delivery of tacrolimus by a carbomer hydrogel formulation with transcutoL® P. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 10, p. 1636-1642, 2016.

LEI, W.; YU, C.; LIN, H.; ZHOU, X. Development of tacrolimus-loaded transfersomes for deeper skin penetration enhancement and therapeutic effect improvement in vivo. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 6, p. 336-345, 2013.

LEMOES, C. N.; PEREIRA, F.; DALMOLIN, L. F.; CUBAYACHI, C.; RAMOS, D. N.; LOPEZ, R. F. V. **Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization**. In: GRUMEZESCU, A. (ed.) Nanostructures for the engineering of cells, tissues and organs. United States of America: Elsevier, 2018, v. 1, cap. 6, p. 187-248.

LI, B.; GE, Z. Q. Nanostructured lipid carriers improve skin permeation and chemical stability of idebenone. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 276-283, 2012.

LI, F.; WENG, Y.; WANG, L.; HE, H.; YANG, J.; TANG, X. The efficacy and safety of bufadienolides-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 203-211, 2010.

LI, G.; FAN, Y.; FAN, C. LI, X.; WANG, X.; LI, M.; LIU, Y. Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 49-57, 2012.

LI, K.; ARMSTRONG, A. W. A review of health outcomes in patients with psoriasis. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n.1, p. 61-72, 2012.

LI, X.; NIE, S. F.; KONG, J.; LI, N.; JU, C. Y.; PAN, W. S. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 177-182, 2008.

LIM, W. H.; TAN, Y. J.; LEE, C. S.; ER, H. M.; WONG, S. F. Preparation and optimization of palm-based lipid nanoparticles loaded with griseofulvin. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 451-461, 2017.

- LIMÓN, D.; DOMÍNGUEZ, K. T.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L.; ANDRADE, B.; CALPENA, A. C.; PÉREZ-GARCÍA, L. Nanostructured supramolecular hydrogels: towards the topical treatment of psoriasis and other skin diseases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 657-670, 2019.
- LIN, A. N. Innovative use of topical calcineurin inhibitors. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 3, p. 535-545, 2010.
- LIN, Y. K.; HUANG, Z. R.; ZHUO, R. Z.; FANG, J. Y. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 117-128, 2010.
- LIU, D.; WU, Q.; CHEN, W.; LIN, H.; ZHU, Y.; LIU, Y.; LIANG, H.; ZHU, F. A novel FK506 loaded nanomicelles consisting of amino-terminated poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L)-lactic acid and hydroxypropyl methylcellulose for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, p. 1-10, 2019.
- LIU, Y. L.; CHEN, D.; SHANG, P.; YIN, D. C. A review of magnet systems for targeted drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 302, p. 90-104, 2019.
- LONNBERG, A.S.; ZACHARIAE, C.; SKOV, L. Targeting of interleukin-17 in the treatment of psoriasis. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 251-259, 2014.
- LÓPEZ-GARCÍA, R.; GANEM-RONDERO, A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 5, n. 2, p. 62-72, 2015.
- MAHIL, S. K.; CAPON, F.; BARKER, J. N. Genetics of psoriasis. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2015.
- MAHRHAUSER, D.; NAGELREITER, C.; BAIERL, A.; SKIPIOL, J.; VALENTA, C. Influence of a multiple emulsion, liposomes and a microemulsion gel on sebum, skin hydration and TEWL. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 2, p. 181-186, 2015.
- MAK, R.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 100, supl. 2, p. 2-13, 2009.
- MALECIC, N.; YOUNG, H. Tacrolimus for the management of psoriasis: clinical utility and place in therapy. **Psoriasis: Targets and Therapy**, v. 6, p. 153-163, 2016.
- MANCONI, M.; SINICO, C. CADDEO, C.; VILA, A. O. VALENTI, D. FADDA, A. M. Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1-2, p. 37-46, 2011.
- MAO, K. L.; FAN, Z. L.; YUAN, J. D.; CHEN, P. P.; YANG, J. J.; XU, J.; ZHUGE, D. L.; JIN, B. H.; ZHU, Q. Y.; SHEN, B. X.; SOHAWON, Y.; ZHAO, Y. Z.; XU, H. L. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery

of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 160, p. 704-714, 2017.

MARCATO, P. D. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; TEDESCO, S. B.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962-971, 2010.

MAREPALLY, S.; BOAKYE, C. H. A.; PATEL, A. R.; GODUGU, C.; DODDAPANENI, R.; DESAI, P. R.; SINGH, M. Topical administration of dual siRNAs using fusogenic lipid nanoparticles for treating psoriatic-like plaques. **Nanomedicine**, v. 9, n. 14, p. 2157-2174, 2014.

MARIANECCI, C.; DI MARZIO, L.; RINALDI, F.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; ALHAIQUE, F.; ESPOSITO, S.; CARAFA, M. Niosomes from 80s to present: the state of the art. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 187-206, 2014.

MARWAH, H.; GARG, T.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 564-578, 2016.

MAYTIN, E. V.; HONARI, G.; KHACHEMOUNE, A.; TAYLOR, C. R.; ORTEL, B. POGUE, B. W.; SZNYCER-TAUB, N.; HASAN, T. The vitamin D analog calcipotriol combined with aminolevulinate-mediated photodynamic therapy for human psoriasis: a proof-of-principle study. **Israel Journal of Chemistry**, v. 52, p. 767-775, 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MELO, K. M.; FASCINELI, M. L.; MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R.; GRISOLIA, C. K.; SANTOS, A. S.; SALGADO, H. L. C.; MUEHLMANN, L. A.; AZEVEDO, R. B.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) oil and nanoemulsion on Swiss mice. **Journal of Nanomaterials**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

MENDONÇA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 353-364, 2007.

MENDONÇA, F. A. C.; SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629-636, 2005.

MERCURI, A.; WU, S.; STRANZINGER, S.; MOHR, S.; SALAR-BEHZADI, S.; BRESCIANI, M.; FRÖHLICH, E. In vitro and in silico characterisation of tacrolimus released under biorelevant conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1-2, p. 271-280, 2016.

MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R.; FASCINELI, M. L. MUEHLMANN, L. A.; MELO, K. M.; SALGADO, H. L. C.; JOANITTI, G. A.; PIECZARKA, J. C.; AZEVEDO, R. B.; SANTOS, A. S. GRISOLIA, C. K. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aublet) nanoemulsions: development and assessment of cytotoxicity, genotoxicity, and hematotoxicity. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R.; FASCINELI, M. L.; ROLL, M. M.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; PIECZARKA, J. C.; SALGADO, H. L. C.; SANTOS, A. S.; GRISOLIA, C. K. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n.2, 248-256, 2016.

MIOT, H. A.; BATISTELLA, R. F.; BATISTA, K. A.; VOLPATO, D. E. C.; AUGUSTO, L. S. T.; MADEIRA, N. G.; HADDAD-JUNIOR, V.; MIOT, L. D. B. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 46, p. 253-256, 2004.

MIOT, H. A.; LAUTERBACH, G. P.; RIBEIRO, F. A. H.; FAVERO, J. E. L.; HERCOS, G. N.; MADEIRA, N. G.; HADDAD-JUNIOR, V. Comparison among homemade repellents made with cloves, picaridin, Andiroba, and soybean oil against *Aedes aegypti* bites. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 44, p. 793-794, 2011.

MOHD ABUL KALAM, M. A.; ALSHAMSAN, A. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for sustained release of tacrolimus in rabbit eyes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 402-411, 2017.

MORIKAWA, T.; NAGATOMO, A.; KITAZAWA, K.; MURAOKA, O.; KIKUCHI, T.; YAMADA, T.; TANAKA, R.; NINOMIYA, K. Collagen synthesis-promoting effects of andiroba oil and its limonoid constituents in normal human dermal fibroblasts. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 10, p. 1271-1277, 2018.

MOYA-ORTEGA, M. D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, p. 153-163, 2012.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 12, p. 1394-1405, 2008.

MÜLLER, F.; HÖNZKE, S.; LUTHARDT, W. O.; WONG, E. L.; UNBEHAUEN, M.; BAUER, J.; HAAG, R.; HEDTRICH, S.; RÜHL, E.; RADEMAN, J. Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 31-37, 2017.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 3, p. 207-227, 2011.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 121-128, 2002.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, suppl. 1, p. S131-S155, 2002.

MURPHY, E. C.; SCHAFFTER, S. W.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology for psoriasis therapy. **Current Dermatology Reports**, v. 8, n. 1, p. 14-25, 2019.

NAGLE, A.; GOYAL, A. K.; KESARLA, R.; MURTHY, R. R. Efficacy study of vesicular gel containing methotrexate and menthol combination on parakeratotic rat skin model. **Journal of Liposome Research**, v. 21, n. 2, p. 134-140, 2011.

NAM, S. H.; JI, X. Y.; PARK, J. S. Investigation of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers for topical drug delivery. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 3, p. 956-960, 2011.

NANJWADE, B. K.; KADAM, V. T.; MANVI, F. V. Formulation and characterization of nanostructured lipid carrier of ubiquinone (Coenzyme Q10). **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 450-460, 2013.

NARAYANASWAMY, R.; TORCHILIN, V. P. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1-18, 2019.

NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 77-84, 2009.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305-313, 2015.

NASR, M.; ABDEL-HAMID, S. Optimizing the dermal accumulation of a tazarotene microemulsion using skin deposition modeling. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 4, p. 636-643, 2016.

NEMATI, H.; GHAHRAMANI, M. H.; FARIDI-MAJIDI, R.; IZADI, B.; BAHRAMI, G.; MADANI, S. H.; TAVOOSIDANA, G. Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 268, 259-268, 2017.

NESTLE, F.; KAPLAN, D.; BARKER, J. Psoriasis: mechanisms of disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 1710, p. 496-509, 2009.

NICKOLOFF, B. J. Cracking the cytokine code in psoriasis. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 242-244, 2007.

NOOR, N. M.; SHEIKH, K.; SOMAVARAPU, S.; TAYLOR, K. M. G. Preparation and characterization of dutasteride-loaded nanostructured lipid carriers coated with stearic acid-chitosan oligomer for topical delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 372-384, 2017.

OCA-ÁVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 1-6, 2017.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for the testing of chemicals**. Skin absorption: in vitro method, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2004a.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**, v. 2, n. 28, p. 1-31, 2004b.

OKUDA, K.; FU, H. Y.; MATSUZAKI, T.; ARAKI, R.; TSUCHIDA, S.; THANIKACHALAM, P. V.; FUKUTA, T.; ASAI, T.; YAMATO, M.; SANADA, S.; ASANUMA, H.; ASANO, Y.; ASAKURA, M.; HANAWA, H.; HAO, H.; OKU, N.; TAKASHIMA, S.; KITAKAZE, M.; SAKATA, Y.; MINAMINO, T. Targeted therapy for acute autoimmune myocarditis with nano-sized liposomal FK506 in rats. **PLOS ONE**, v. 11, p. 1-14, 2016.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo de ação repelente frente a Aedes aegypti**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. DOI: 10.11606/D.60.2008.tde-31032009-132918.

OLIVEIRA, E. C. V.; MACIEL, N. R.; AMARAL, L. Q.; ROCHA-FILHO, P. A. Natural brazilian raw material to develop O/W emulsions containing lamellar gel phase (development and analysis of emulsion with vegetable oils). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 12, p. 1656-1662, 2013.

OLIVEIRA, I. S. S.; MORAGAS, T. C. J.; CHAGAS, M. S. S.; BEHRENS, M. D.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L.; ALMEIDA-SOUZA, F. *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) seed oil: chemical composition and antileishmanial activity of limonoid-rich fractions. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

ORATA, F. **Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis**. In: MOHD, M. A. *Advanced gas chromatography - progress in agricultural, biomedical and industrial applications*. 1. ed. Croatia: Intech, 2102. p. 83-108.

PANONNUMMAL, R. SABITHA, M. Anti-psoriatic and toxicity evaluation of methotrexate loaded chitin nanogel in imiquimod induced mice model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 245-258, 2018.

PANONNUMMAL, R.; JAYAKUMAR, R.; SABITHA, M. Comparative anti-psoriatic efficacy studies of clobetasol loaded chitin nanogel and marketed cream. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 193-206, 2017.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PARDEIKE, J.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H. Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 166-173, 2010.

PARDEIKE, J.; WEBER, S.; HABER, T.; WAGNER, J.; ZARFL, H. P.; PLANK, H.; ZIMMER, A. Development of an itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1, p. 329-338, 2011.

PARHI, R.; SURESH, P. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles - a review. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 9, p. 2-16, 2012.

PATEL, M. R.; PATEL, R. B.; PARIKH, J. R.; PATEL, B. G. Novel microemulsion-based gel formulation of tazarotene for therapy of acne. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 8, p. 1-12, 2015.

PATEL, P.; MEHTA, T.; PANCHAL, S. Preparation, evaluation and comparison of lipid based drug delivery systems of tacrolimus. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 588-591, 2014.

PATEL, P.; PATEL, H.; PANCHAL, S.; MEHTA, T. Self micro-emulsifying drug delivery system of tacrolimus: Formulation, in vitro evaluation and stability studies. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 13, n. 2, p. 95-104, 2013.

PATEL, P. V.; PANCHAL, S. S.; MEHTA, T. A. Improvement of dissolution rate of tacrolimus by solid dispersion technique. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 1, p. 45-53, 2013.

PATEL, P.; PANCHAL, S.; MEHTA, T.; SOLANKI, S.; PATEL, C.; Reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for determination of tacrolimus in bulk and pharmaceutical formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 220-222, 2011.

PATEL, P.; PATEL, H.; PANCHAL, S.; MEHTA, T. Formulation strategies for drug delivery of tacrolimus: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 4, p. 169-175, 2012.

PATEL, S. S.; PATEL, M. S.; SALAMPURE, S.; VISHWANATH, B.; PATEL, N. M. Development and evaluation of liposomes for topical delivery of tacrolimus (FK-506). **Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 3, p. 585-596, 2010.

PATIL-GADHE, A.; POKHARKAR, V. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers. Part I: oral bioavailability improvement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 160-168, 2014.

PATLOLLA, R. R.; CHOUGULE, M.; PATEL, A. R.; JACKSON, T.; TAPA, P. N.; SINGH, M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. **Journal of Control Release**, v. 144, n. 2, p. 233-241, 2010.

PAWAR, S. K.; VAVIA, P. R. Rice germ oil as multifunctional excipient in preparation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 254-261, 2012.

PENIDO, C.; CONTE, F. P.; CHAGAS, M. S. S.; RODRIGUES, C. A. B.; PEREIRA, J. F. G.; HENRIQUES, M. G. M. O. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 55, n. 11, p. 457-464, 2006.

PENIDO, C.; COSTA, K. A.; PENNAFORTE, R. J.; COSTA, M. F. S.; PEREIRA, J. F. G.; HENRIQUES, M. G. M. O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, v. 54, n. 1, p. 295-303, 2005.

PINTO, F.; DE BARROS, D. P. C.; REIS, C.; FONSECA, L. P. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 1-13, 2019.

PINTO, F. C. M.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; DE-CARVALHO, R. R.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; COELHO, D. R.; LIMA, S. V. C.; PAUMGARTEN, F. J. R.; AGUIAR, J. L. A. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556-560, 2016.

PINTO, M. F.; MOURA, C. C.; NUNES, C.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, S. A. C.; REIS, S. A new topical formulation for psoriasis: development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1, p. 519-526, 2014.

PLANZ, V.; LEHR, C. M.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89-104, 2016.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 82-94, 2011.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis - part II: in vivo assessment of dermatopharmacokinetics, biodistribution and efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 70-79, 2012.

- POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. **International Journal Pharmaceutics**, v. 398, n.1, p. 165-178, 2010.
- PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P. M.; ASCENSO, A.; BENTLEY, M. V. L. B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.
- PRADHAN, M.; SINGH, D.; MURTHY, S. N.; SINGH, M. R. Design, characterization and skin permeating potential of fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **Steroids**, v. 101, p. 56-63, 2015.
- PRADHAN, M.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Fabrication, optimization and characterization of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis: application of box Behnken design, in vitro and ex vivo studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 325-333, 2017.
- PRADHAN, M.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Influence of selected variables on fabrication of triamcinolone acetonide loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of dermal disorders. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 392-400, 2016.
- PRADHAN, M.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Novel colloidal carriers for psoriasis: current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 380-395, 2013.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063-1072, 2008.
- PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.
- PUGLIA, C.; LAURO, M. R.; OFFERTA, A.; CRASCI, L. MICICCHÈ, L.; PANICO, A. M.; BONINA, F. PUGLISI, G. Nanostructured lipid carriers (NLC) as vehicles for topical administration of sesamol: in vitro percutaneous absorption study and evaluation of antioxidant activity. **Planta Medica**, v. 83, n. 5, p. 398-404, 2016.
- PUIG, L.; JULIÀ, A.; MARSAL, S. The pathogenesis and genetics of psoriasis. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 105, supl. 6, p. 535-545, 2014.
- PURI, A.; LOOMIS, K.; SMITH, B.; LEE, J. H.; YAVLOVICH, A.; HELDMAN, E.; BLUMENTHAL, R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 6, p. 523-580, 2009.
- QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000-1008, 2011.

QURESHI, M. A.; KHATOON, F. Different types of smart nanogel for targeted delivery. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 4, n. 2, p. 201-212, 2019.

RAHMAN, M.; AKHTER, S.; AHMAD, S. J.; AHMAD, M. Z.; BEG, S.; AHMAD, F. J. Nanomedicine-based drug targeting for psoriasis: potentials and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 4, p. 635-652, 2015.

RAHMAN, Z.; BYKADI, S.; SIDDIQUI, A.; KHAN, M. A. Comparison of X-ray powder diffraction and solid-state nuclear magnetic resonance in estimating crystalline fraction of tacrolimus in sustained-release amorphous solid dispersion and development of discriminating dissolution method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1777-1786, 2015.

RAHMAN, Z.; SIDDIQUI, A.; BYKADI, S.; KHAN, M. A. Near-infrared and Fourier transform infrared chemometric methods for the quantification of crystalline tacrolimus from sustained-release amorphous solid dispersion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2376-2385, 2014.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A.; KHAN, M. A. **Tacrolimus properties and formulations: potential impact of product quality on safety and efficacy**. In: RAPTIS, D.; PRAMATEFTAKIS, M-G. (Org.). Tacrolimus: effectiveness, safety and drug interactions. New York: Nova Science Publishers, 2013. cap.1, p. 1-39.

RAJINIKANTH, P.; CHELLIAN, J. Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5067-5077, 2016.

RANCAN, F.; VOLKMANN, H.; GIULBUDAGIAN, M.; SCHUMACHER, F.; STANKO, J. I.; KLEUSER, B.; BLUME-PEYTAVI, U.; CALDERÓN, M.; VOGT, A. Dermal delivery of the high-molecular-weight drug tacrolimus by means of polyglycerol-based nanogels. **Pharmaceutics**, v. 11, p. 2-14, 2019.

RAYCHAUDHURI, S. K.; MAVERAKIS, E.; RAYCHAUDHURI, S. P. Diagnosis and classification of psoriasis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 490-495, 2014.

RAZA, K.; KATARE, O.; SETIA, A.; BHATIA, A.; SINGH, B. Improved therapeutic performance of dithranol against psoriasis employing systematically optimized nanoemulsomes. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, p. 225-236, 2013.

RAZA, K.; NEGI, P.; TAKYAR, S.; SHUKLA, A.; AMARJI, B.; KATARE, O. P. Novel dithranol phospholipid microemulsion for topical application: development, characterization and percutaneous absorption studies. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 3, p. 190-199, 2011.

RAZA, K.; SINGH, B.; LOHAN, S.; SHARMA, G.; NEGI, P.; YACHHA, Y.; KATARE, O. P. Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 65-72, 2013.

REGULATION (EC). **Official Journal of the European Union n. 1223/2009 of the European parliament and of the council, of 30 November 2009 on cosmetic products.** Official Journal of the European Union. L 342/59, p. 59, 22 dez. 2009.

REHMAN, K.; ZULFAKAR, M. H. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 4, p. 433-440, 2014.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64-70, 2018.

ROBERTS, M. S.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M. N.; NAMJOSHI, S.; YOUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I. N. ABD, E.; LEITE-SILVA, V. R.; BENSON, H. A. E.; GRICE, J. E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86-105, 2017.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. **Fatty acids: structures and properties**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005, 5 p.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SAHU, S.; KATIYAR, S. S.; KUSHWAH, V.; JAIN, S. Active natural oil-based nanoemulsion containing tacrolimus for synergistic antipsoriatic efficacy. **Nanomedicine**, v. 13, n. 16, p. 1985-1988, 2018.

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1, p. 1-17, 2018.

SALA, M.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Advances in psoriasis physiopathology and treatments: Up to date of mechanistic insights and perspectives of novel therapies based on innovative skin drug delivery systems (ISDDS). **Journal of Controlled Release**, v. 239, p. 182-202, 2016.

SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete - a review. **Construction and Building Materials**, v. 24, n. 11, p. 2060-2071, 2010.

SANTOS, O. D. H.; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; AGUIAR, F. F.; ROCHA FILHO, P. A. Development of vegetable oil emulsions with lamellar liquid-crystalline structures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 433-438, 2011.

SANTOS, F. K.; OYAFUSO, M. H.; KIILL, C. P.; DAFLON-GREMIÃO, P. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of hyperproliferative skin diseases - a review. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 1, p. 159-167, 2013.

SARAIVA, S. A.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles

from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4030-4034, 2009.

SARASWAT, A.; AGARWAL, R.; KATARE, O. P.; KAUR, I.; KUMAR, B. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study of a novel liposomal dithranol formulation in psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 18, p. 40-45, 2007.

SARRA, M.; CARUSO, R.; CUPI, M. L.; MONTELEONE, I.; STOLFI, C.; CAMPIONE, E.; DILUVIO, L.; MAZZOTTA, A.; BOTTI, E.; CHIMENTI, S.; COSTANZO, A.; MACDONALD, T. T.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. IL-21 promotes skin recruitment of CD4⁺ cells and drives IFN- γ -dependent epidermal hyperplasia. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5435-5442, 2011.

SATHE, P.; SAKA, R.; KOMMINENI, N.; RAZA, K.; KHAN, W. Dithranol-loaded nanostructured lipid carrier-based gel ameliorate psoriasis in imiquimod-induced mice psoriatic plaque model. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 5, p. 826-838, 2019.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMS, A. I. H.; DE ANDRADE, D. F.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science Engineering: C**, v. 46, p. 69-76, 2015.

SAVIĆ, V.; TODOSIJEVIĆ, M.; ILIĆ, T.; LUKIĆ, M.; MITSOU, E.; PAPADIMITRIOU, V.; AVRAMIOTIS, S.; MARKOVIĆ, B.; CEKIĆ, N.; SAVIĆ, S. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: structure characterization and in vitro/in vivo performances. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1-2, p. 491-505, 2017.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery**, v. 57, n. 6, p. 427-443, 2007.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1, p. 51-56, 2001.

SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 18, p. 1899-1912, 2005.

SCHÜTTE-NÜTGEN, K.; THÖLKING, G.; SUWELACK, B.; REUTER, S. Tacrolimus - pharmacokinetic considerations for clinicians. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 342-350, 2018.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. LUCKS, J. S. MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83-96, 1994.

SCHWARZ, J. C.; WEIXELBAUM, A.; PAGITSCH, E.; LÖW, M.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 83-88, 2012.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1150-1158, 2006.

SEHGAL, V. N.; SRIVASTAVA, G.; DOGRA, S. Tacrolimus in dermatology-pharmacokinetics, mechanism of action, drug interactions, dosages, and side effects: Part I. **SKINmed: Dermatology for the Clinician**, v. 7, n. 1, p. 27-30, 2008a.

SEHGAL, V. N.; SRIVASTAVA, G.; DOGRA, S. Tacrolimus: approved and unapproved dermatologic indications/uses-physician's sequential literature survey: part II. **SKINmed: Dermatology for the Clinician**, v. 7, n. 2, p. 73-77, 2008b.

SENHORINI, G. A.; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. MARQUES, F. A. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: preparation and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1121-1126, 2012.

SEO, J.; LEE, C.; HWANG, H. S.; KIM, B.; THAO, L. Q.; LEE, E. S.; OH, K. T.; LIM, J. L.; CHOI, H. G.; YOUN, Y. S. Therapeutic advantage of inhaled tacrolimus-bound albumin nanoparticles in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 36, p. 53-61, 2016.

SHEN, J.; DENG, Y.; JIN, X.; PING, Q.; SU, Z.; LI, L. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: improving in vivo ocular distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 402, p. 248-253, 2010.

SHEN, J.; WANG, Y.; PING, Q.; XIAO, Y.; HUANG, X. Mucoadhesive effect of thiolated PEG stearate and its modified NLC for ocular drug delivery. **Journal of Control Release**, v. 137, p. 217-223, 2009.

SHI, F.; YANG, G.; REN, J.; GUO, T.; DU, Y.; FENG, N. Formulation design, preparation, and in vitro and in vivo characterizations of β -elemene-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2533-2541, 2013.

SHIRSATH, N. R.; GOSWAMI, A. K. Nanocarriers based novel drug delivery as effective drug delivery: a review. **Current Nanomaterials**, v. 4, n. 2, p. 71-83, 2019.

SIDDIQUI, A.; RAHMAN, Z.; BYKADI, S.; KHAN, M. A. Chemometric methods for the quantification of crystalline tacrolimus in solid dispersion by powder X-ray diffractometry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 9, p. 2819-2828, 2014.

SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; CABRAL, E. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 738-744, 2010.

SINGH, A.; MALVIYA, R.; SHARMA, P. K. Novasome-A breakthrough in pharmaceutical technology a review article. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 4, p. 184-189, 2011.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SINKO, P. J. **Martin ' s physical pharmacy and pharmaceutical sciences**. Physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2011, 1231 p.

SONAWANE, R.; HARDE, H.; KATARIYA, M.; AGRAWAL, S.; JAIN, S. Solid lipid nanoparticles-loaded topical gel containing combination drugs: an approach to offset psoriasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 12, p. 1833-1847, 2014.

SONG, S. H.; LEE, K. M.; KANG, J. B.; LEE, S. G.; KANG, M. J.; CHOI, Y. W. Improved skin delivery of voriconazole with a nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 793-798, 2014.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2004.

SRINARONG, P.; PHAM, B. T.; HOLEN, M.; PLAS, A.; SCHELLEKENS, R. C. A.; HINRICHS, W. L. J.; FRIJLINK, H. W. Preparation and physicochemical evaluation of a new tacrolimus tablet formulation for sublingual administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 4, p. 490-500, 2012.

SRISUK, P.; THONGNOPNUA, P.; RAKTANONCHAI, U.; KANOKPANONT, S. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 426-434, 2012.

SUN, R.; XIA, Q. Nanostructured lipid carriers incorporated in alginate hydrogel: enhanced stability and modified behavior in gastrointestinal tract. **Colloids and Surfaces A**, v. 574, p. 197-206, 2019.

TADROS, T. **Colloid and interface aspects of pharmaceutical science**. In: OHSHIMA, H.; MAKINO, K. Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development. United Kingdom: Elsevier, 2014, p. 29-54.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 29-43, 2013.

TANDON, Y. K.; YANG, M. F.; BARON, E. D. Role of photodynamic therapy in psoriasis: a brief review. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 24, p. 222-230, 2008.

- TAPADIYA, G. G.; KALE, M. A.; SABOO, S. S. Impact of nanotechnology on global trade of herbal drugs: an overview. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 11, n. 3, p. S371-S376, 2017.
- TAPPIN, M. R. R.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 4, p. 1090-1095, 2008.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H.; JUNYAPRASERT, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 134-141, 2008.
- THAO, L. Q.; BYEON, H. J.; LEE, C.; LEE, S.; LEE, E. S.; CHOI, H. G.; PARK, E. S.; YOUN, Y. S. Pharmaceutical potential of tacrolimus-loaded albumin nanoparticles having targetability to rheumatoid arthritis tissues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 497, p. 268-276, 2016.
- THAPA, R. K.; BASKARAN, R.; MADHESWARAN, T.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; YOO, B. K. In vitro release and skin permeation of tacrolimus from monoolein-based liquid crystalline nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 479-484, 2012.
- THAPA, R. K.; BASKARAN, R.; MADHESWARAN, T.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; YOO, B. K. Preparation, characterization, and release study of tacrolimus-loaded liquid crystalline nanoparticles. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 72-77, 2013.
- THAPA, R. K.; YOO, B. K. Evaluation of the effect of tacrolimus-loaded liquid crystalline nanoparticles on psoriasis-like skin inflammation. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 25, n. 1, p. 22-25, 2014.
- TIAN, B.; LUO, Q.; SONG, S.; LIU, D.; PAN, H.; ZHANG, W.; HE, Li.; MA, S.; YANG, X.; PAN, W. Novel surface-modified nanostructured lipid carriers with partially deacetylated water-soluble chitosan for efficient ocular delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 1040-1049, 2012.
- TRAN, T. H.; RAMASAMY, T.; TRUONG, D. H.; CHOI, H. G.; YONG, C. S.; KIM, J. O. Preparation and characterization of fenofibrate-loaded nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 6, p. 1509-1515, 2014.
- TRAN, T.; ROUSSEAU, D. Influence of shear on fat crystallization. **Food Research International**, v. 81, p. 157-162, 2016.
- TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1-2, p. 119-125, 2004.

UMEZAWA, Y.; OZAWA, A. Optimal time for therapeutic drug monitoring of cyclosporine microemulsion in patients with psoriasis. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 7, p. 763-766, 2007.

USP. United State Pharmacopeia / National Formulary. **Topical and transdermal drug products**. Pharmacopeial Forum, v. 35, n. 3, p. 750-764, 2009.

ÜSTÜNDAG-OKUR, N.; GÖKÇE, E. H.; BOZBIYIK, D. I.; EGRILMEZ, S.; ÖZER, Ö.; ERTAN, G. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nanostructured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, p. 204-215, 2014.

VARENNE, F.; BOTTON, J.; MERLET, C.; HILLAIREAU, H.; LEGRAND, F. X.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Size of monodispersed nanomaterials evaluated by dynamic light scattering: protocol validated for measurements of 60 and 203 nm diameter nanomaterials is now extended to 100 and 400 nm. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1-2, p. 245-253, 2016.

VARENNE, F.; BOTTON, J.; MERLET, C.; VACHON, J. J.; GEIGER, S.; INFANTE, I. C.; CHEHIMI, M. M.; VAUTHIER, C. Standardization and validation of a protocol of zeta potential measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 486, p. 218-231, 2015.

VAUCHER, R. A.; GIONGO, J. L.; BOLZAN, L. P.; CÔRREA, M. S.; FAUSTO, V. P.; ALVES, C. F. S.; LOPES, L. Q. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MOREIRA, A. P.; BRANDELLI, A.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2015.

VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Review**, v.55, n. 4, p.519-548, 2003.

VENTURINI, C. G.; BRUINSMANN, F. A.; CONTRI, R. V.; FONSECA, F. N.; FRANK, L. A.; D'AMORE, C. M.; RAFFIN, R. P.; BUFFON, A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 2, p. 36-43, 2015.

VICARI-CHRISTENSEN, M.; REPPER, S.; BASILE, S.; YOUNG, D. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. **Progress in Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 277-284, 2009.

VISCIDO, A; CAPANNOLO, A.; LATELLA, G.; CAPRILLI, R.; FRIERI, G. Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 9, p. 903–918, 2014.

- VIVEK, B.; HEMA, N.; DARSHANA, H. Design and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 13-21, 2008.
- VIVEK, K.; REDDY, H.; MURTHY, R. S. R. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, p. 16-24, 2007.
- VON SUESSKIND-SCHWENDI, M.; GRUBER, M.; TOURAUD, D.; KUNZ, W.; SCHMID, C.; HIRT, S. W.; LEHLE, K. Pharmacokinetics of a self-microemulsifying drug delivery system of tacrolimus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, p. 469-473, 2013.
- WAGHMARE, S.; PATIL, A.; PATIL, P. Novasome: advance in liposome and niosome. **The Pharma Innovation Journal**, v. 5, n. 5, p. 34-38, 2016.
- WAN, T.; PAN, J.; LONG, Y.; YU, K.; WANG, Y.; PAN, W.; RUAN, W.; QIN, M.; WU, C.; XU, Y. Dual roles of TPGS based microemulsion for tacrolimus: enhancing the percutaneous delivery and anti-psoriatic efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, p. 511-523, 2017.
- WANG, R.; LI, L.; WANG, B.; ZHANG, T.; SUN, L. FK506-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterization and in vitro transdermal drug delivery. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 12, p. 904-913, 2012.
- WANG, Y.; SUN, J.; ZHANG, T.; LIU, H.; HE, F.; HE, Z. Enhanced oral bioavailability of tacrolimus in rats by selfmicroemulsifying drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, p. 1225-1230, 2011.
- WANG, Y.; WANG, C.; FU, S.; LIU, Q.; DOU, D.; LV, H.; FAN, M.; GUO, G.; LUO, F.; QUIAN, Z. Preparation of Tacrolimus loaded micelles based on poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p. 184-189, 2011.
- WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 20, n. 2-3, p. 131-145, 1996.
- WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7-22, 2014.
- WHO. World Health Organization. **Global Report on Psoriasis**, p. 1-45, 2016.
- WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020-1037, 2012.
- XIA, Q.; SAUPE, A.; MÜLLER, R. H.; SOUTO, E. B. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, n. 6, p. 473-482, 2007.
- PAN, W.; QIN, M.; ZHANG, G.; LONG, Y.; RUAN, W.; PAN, J.; WU, Z.; WAN, T.; WU, C. XU, Y. Combination of hydrotropic nicotinamide with nanoparticles for enhancing

tacrolimus percutaneous delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4037-4050, 2016.

YADAV, N.; KHATAK, S.; SARA, U. V. S. Solid lipid nanoparticles - a review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 8-18, 2013.

YAMAMOTO, K.; KLOSSEK, A.; FUCHS, K.; WATTS, B.; RAABE, J.; FLESCH, R.; RANCAN, F.; PISCHON, H.; RADBRUCH, M.; GRUBER, A. D.; MUNDHENK, L.; VOGT, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; SCHRADER, P.; BACHMANN, S.; GURNY, R.; RÜHL, E. Soft X-ray microscopy for probing of topical tacrolimus delivery via micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 139, p. 68-75, 2019.

YAMANAKA, M.; YOKOTA, S.; IWAO, Y.; NOGUCHI, S.; ITAI, S. Development and evaluation of a tacrolimus cream formulation using a binary solvent system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, p. 19-26, 2014.

YU, Q.; HU, X.; MA, Y.; XIE, Y.; LU, Y.; QI, J.; XIANG, L.; LI, F.; WU, W. Lipids-based nanostructured lipid carriers (NLCs) for improved oral bioavailability of sirolimus. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1469-1475, 2016.

ZHANG, P.; WU, M. X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 173-180, 2018.

ZENG, W.; LI, Q.; WAN, T.; LIU, C.; PAN, W.; WU, Z.; ZHANG, G.; PAN, J.; QIN, M.; LIN, Y.; WU, C.; XU, Y. Hyaluronic acid-coated niosomes facilitate tacrolimus ocular delivery: mucoadhesion, precorneal retention, aqueous humor pharmacokinetics, and transcorneal permeability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 28-35, 2016.
ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90-99, 2014.

ZHANG, H.; WANG, Q.; LIU, T.; ZHANG, Y.; QIAN, A.; XIA, Q. Development and characterization of alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier hydrogel. **Integrated Ferroelectrics**, v. 179, p. 130-139, 2017.

ZHANG, T.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; SHEN, Q.; PAN, W. Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 174-179, 2011.

ZHANG, Y. T.; SHEN, L. N.; WU, Z. H.; ZHAO, J. H. FENG, N. P. Comparison of ethosomes and liposomes for skin delivery of psoralen for psoriasis therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 449, 452, 2014.

ZHAO, C.; FAN, T.; YANG, Y.; WU, M.; LI, L.; ZHOU, Z.; JIAN, Y.; ZHANG, Q.; HUANG, Y. Preparation, macrophages targeting delivery and anti-inflammatory study of pentapeptide grafted nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, p. 11-20, 2013.

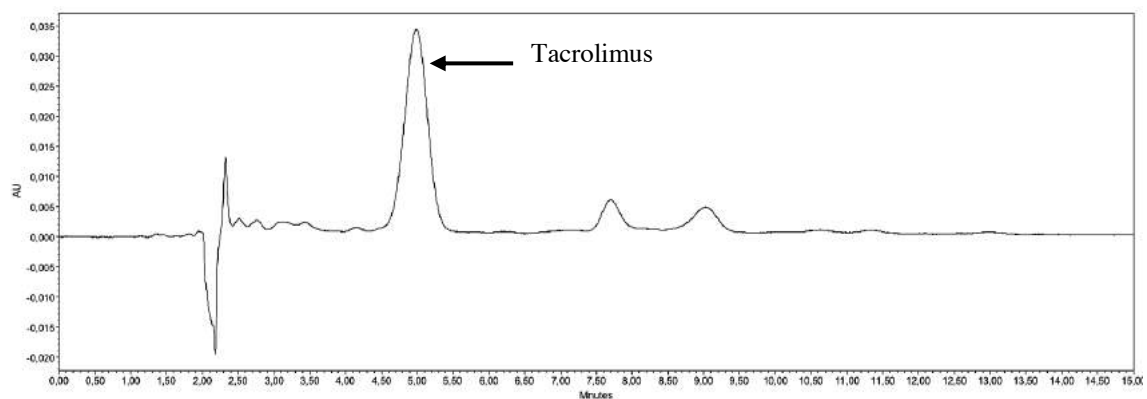
ZHAO, L.; ZHOU, Y.; GAO, Y.; MA, S.; ZHANG, C.; LI, J.; WANG, D.; LI, X.; LI, C.; LIU, Y.; LI, X. Bovine serum albumin nanoparticles for delivery of tacrolimus to reduce its

kidney uptake and functional nephrotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 180-187, 2015.

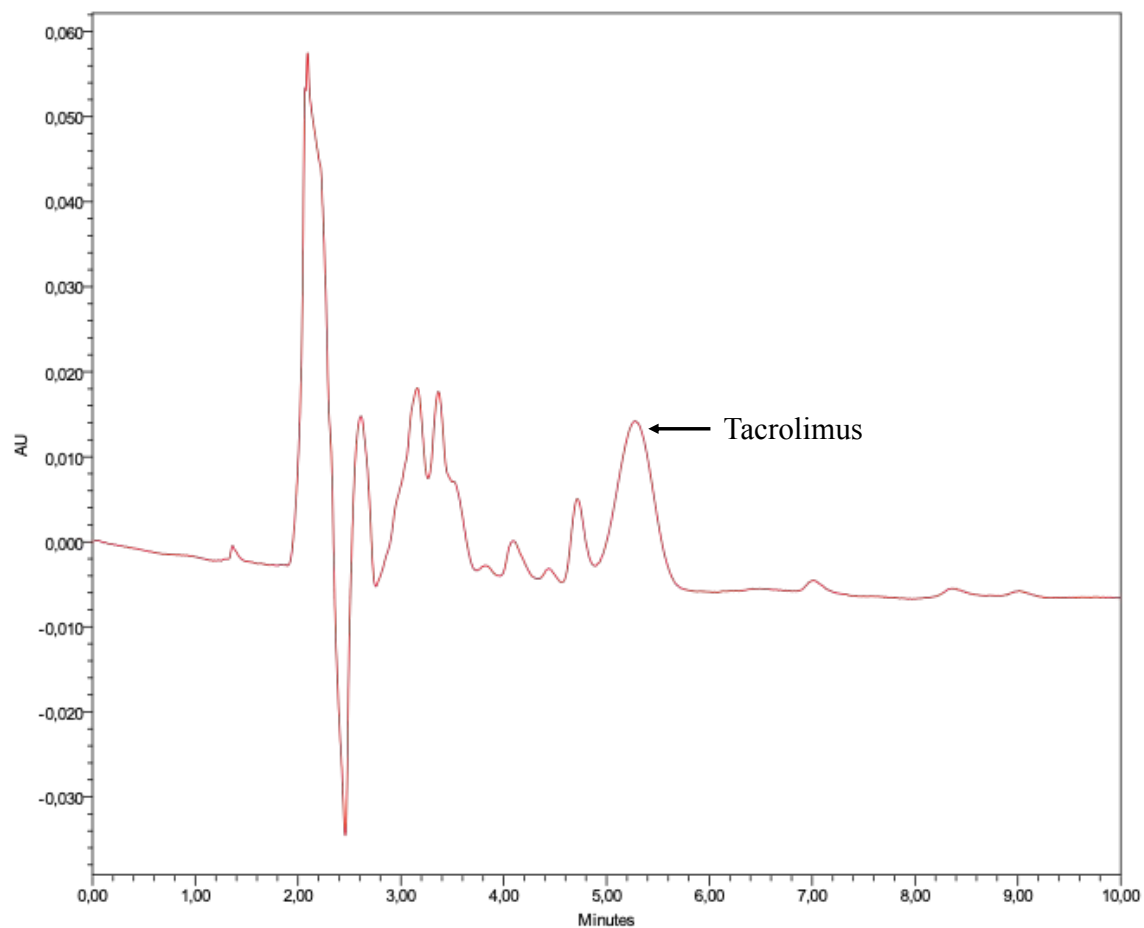
ZHAO, X.; CHEN, Q.; LIU, W.; LI, Y.; TANG, H.; LIU, X.; YANG, X. Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 257-270, 2014.

ZHU, Q.; GUO, T.; XIA, D.; LI, X.; ZHU, C.; LI, H.; OUYANG, D.; ZHANG, J.; GAN, Y. Pluronic F127-modified liposome-containing tacrolimus-cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 1107-1117, 2013.

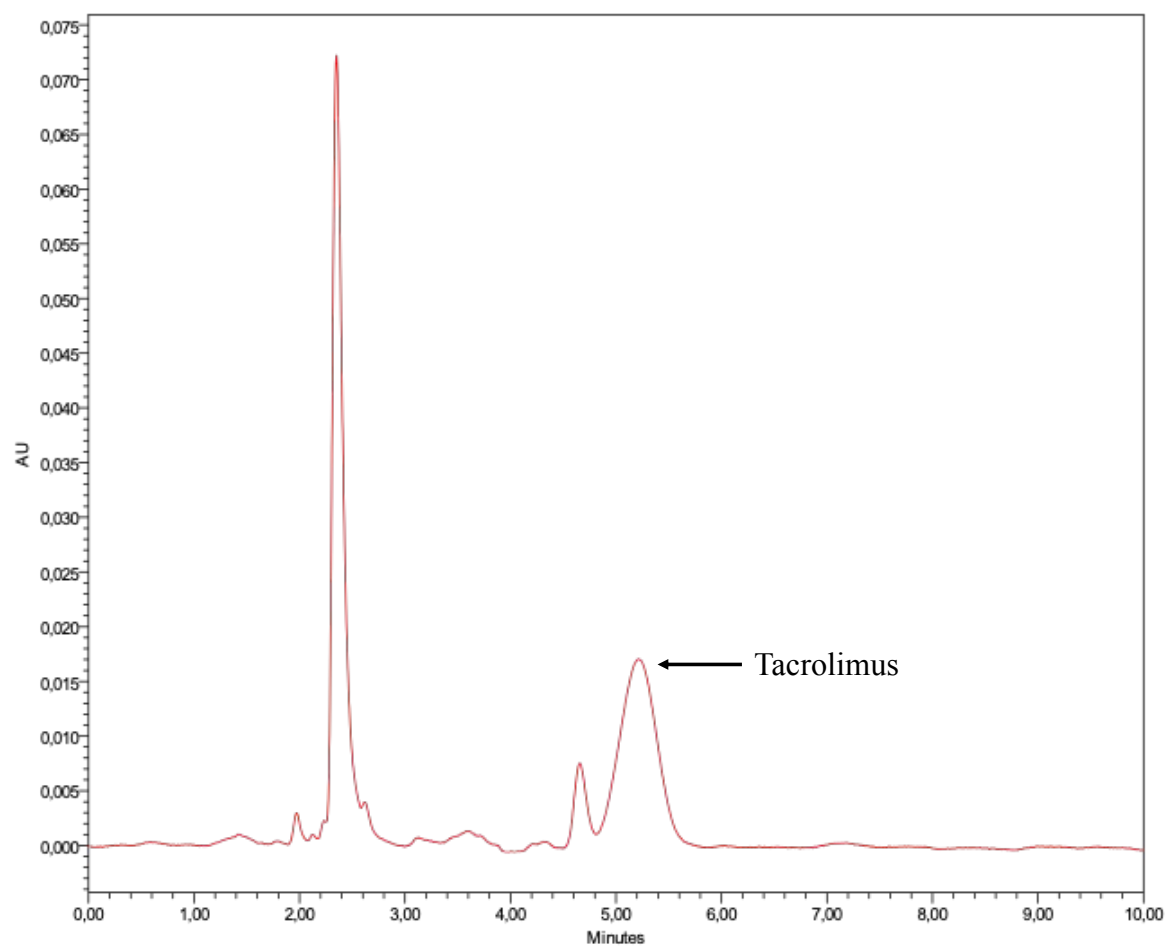
ZHUO, F.; ABOUREHAB, M. A. S.; HUSSAIN, Z. Hyaluronic acid decorated tacrolimus-loaded nanoparticles: efficient approach to maximize dermal targeting and anti-dermatitis efficacy. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 478-489, 2018.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DO TACROLIMUS EM ACETONITRILA (20 µg/mL).

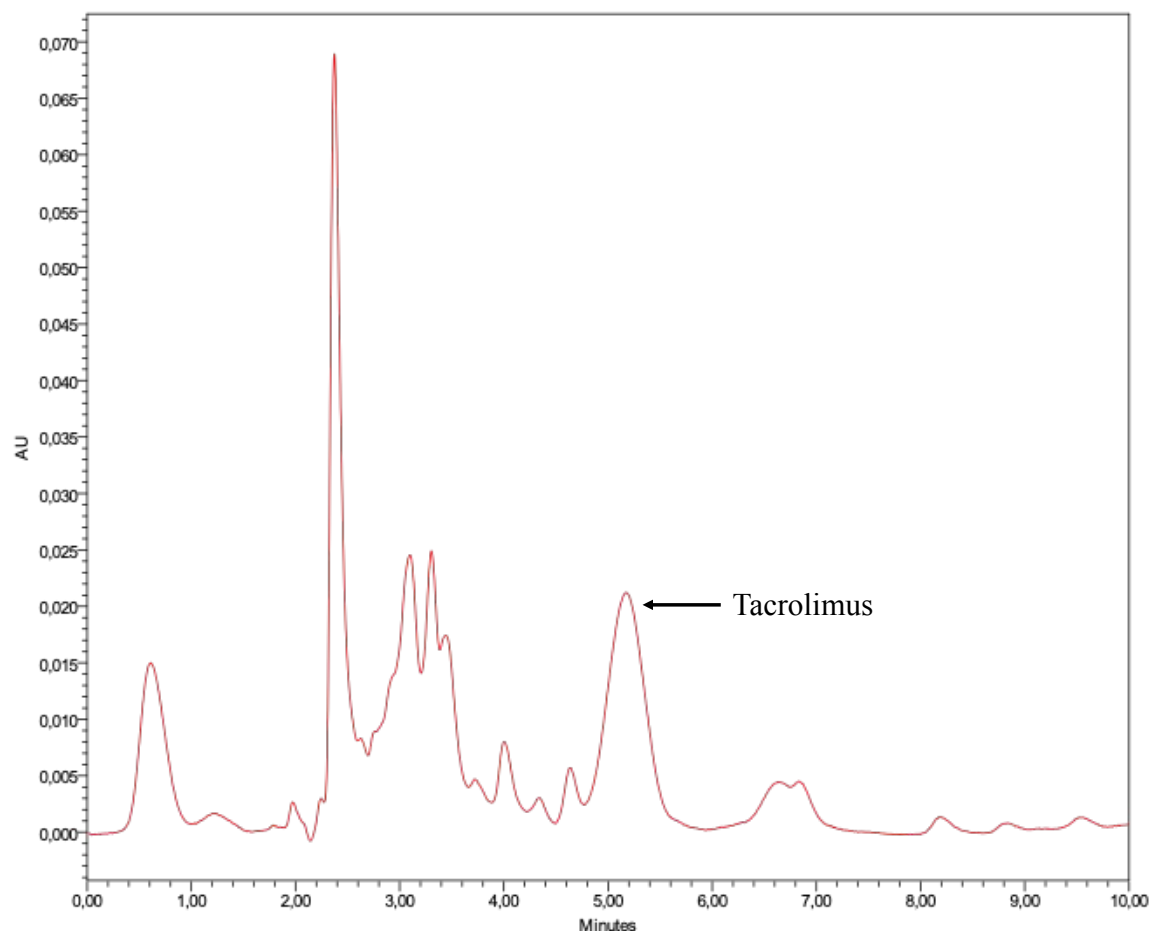
**APÊNDICE B – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NOS
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO DE ANDIROBA (CLN)
(20 µg/mL).**



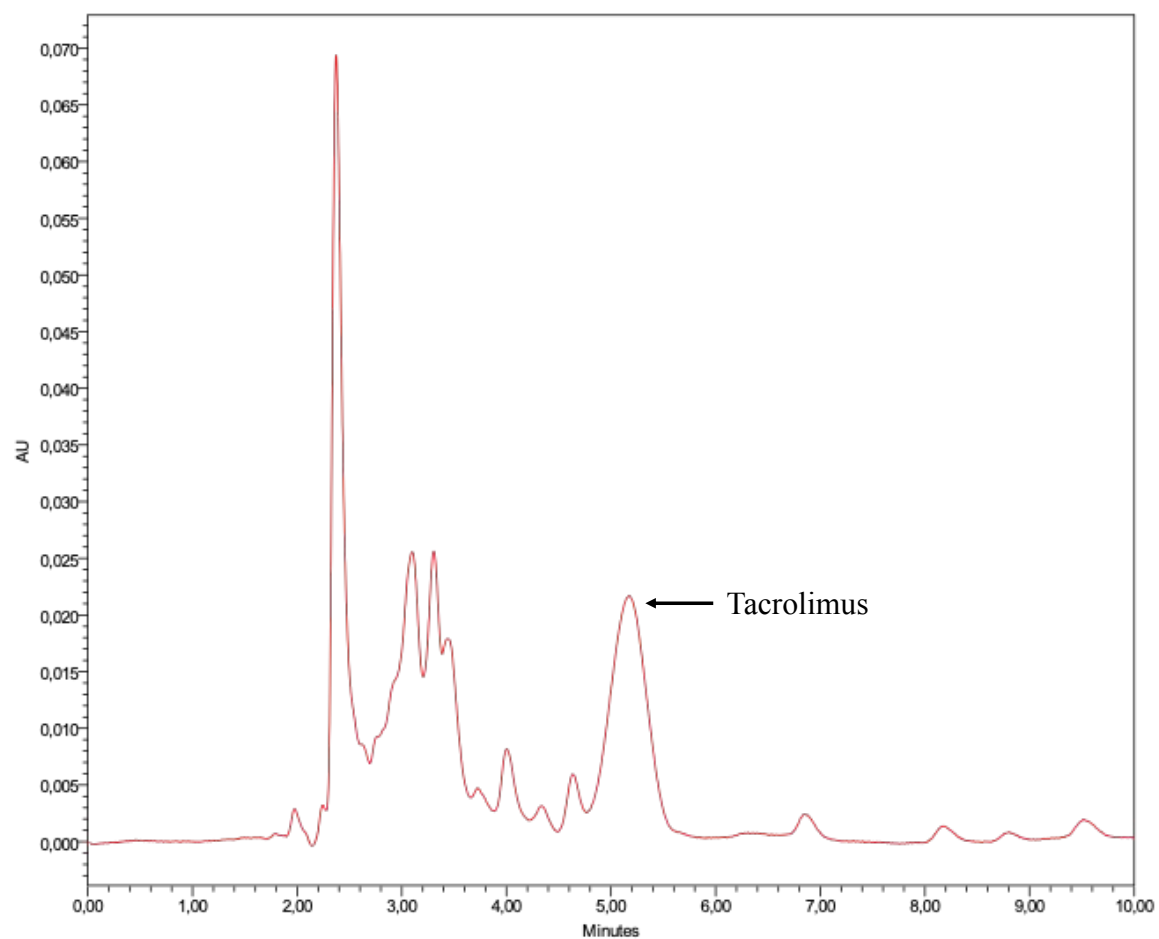
**APÊNDICE C – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NO
BIOHIDROGEL HÍBRIDO (ZBP-HEC) (20 µg/mL).**



**APENDICE D – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NO
ESTRATO CÓRNEO (EC) (20 µg/mL).**



**APÊNDICE E – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NA PELE
REMANESCENTE (PR) (20 µg/mL).**



**APÊNDICE F – CROMATOGRAMA DA SELETIVIDADE DO TACROLIMUS NA FITA
ADESIVA (40 µg/mL).**

