



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Departamento de Farmácia

**NANOEMULSÃO CONTENDO DIPROPIONATO DE
BETAMETASONA: AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA PARA
O TRATAMENTO DE PSORÍASE**

Orientando: João Gabriel Passos Machado (14/0145541)

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Coorientadora: Camila Oliveira Cardoso

Brasília - DF

2020

JOÃO GABRIEL PASSOS MACHADO

NANOEMULSÃO CONTENDO DIPROPIONATO DE BETAMETASONA:
AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA PARA O TRATAMENTO DE
PSORÍASE

Monografia apresentada ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito
parcial de obtenção do Título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Coorientadora: Camila Oliveira Cardoso

Brasília - DF
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Gabriel Passos Machado

Nanoemulsão contendo dipropionato de betametasona: avaliação da permeação cutânea para o tratamento de psoríase

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico



Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo o coração á todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma no processo de desenvolvimento deste trabalho, e durante toda a minha formação!

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso e a minha co-orientadora, Camila Oliveira por toda a sabedoria transmitida, que por meses me acompanharam e me auxiliaram de forma muito atenciosa.

Aos meus familiares, meu porto seguro, por todo suporte e incentivo em toda a minha vida e sobretudo por sempre terem dado tudo de si para me proporcionar as melhores condições no meu processo educacional.

A todos os meus amigos que acompanharam todo esse processo, me apoiaram, compartilharam os momentos felizes e foram meu refúgio nos momentos de estresse.

Aos colegas do laboratório pela disposição e colaboração durante os processos e testes da pesquisa.

Aos colegas e professores do curso pelos ricos ensinamentos e pela atenção durante toda a formação.

RESUMO

A psoríase é uma das dermatoses mais comuns em todo o mundo, que afeta de 2 a 5% da população mundial. É uma doença crônica e auto inflamatória da pele que resulta em hiperproliferação e diferenciação aberrante dos queratinócitos. Seu tratamento tem como pilar principal a terapia tópica com corticosteroides, entre eles o dipropionato de betametasona, que, embora seja um esteroide potente, tem uma absorção limitada através da pele, o que resulta em uma limitação importante no sucesso do tratamento. Com o objetivo de superar esta limitação, esse trabalho propôs o desenvolvimento de uma nanoemulsão para incorporar o dipropionato de betametasona. A nanoemulsão foi desenvolvida através da construção de um diagrama de fases por emulsificação espontânea e o fármaco incorporado a formulação com o auxílio de ultrassom. A nanoemulsão foi caracterizada avaliando-se o tamanho de gotículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, condutividade e pH. A formulação obteve tamanho médio de gotícula de $23,5 \pm 0,4$ nm, PDI = $0,20 \pm 0,01$, potencial zeta = $-4,2 \pm 1,7$ mV, condutividade 47,1 uS/cm e pH 6,0. Foi validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do fármaco que foi considerado seletivo e linear. A absorção do dipropionato de betametasona na pele foi determinada por teste de permeação *in vitro* em pele de orelha de suíno em células de difusão do tipo “Franz”. O teste foi conduzido por período de 24 h de forma comparativa a um creme e uma pomada encontrados no mercado. O teste de permeação no estrato córneo demonstrou que o dipropionato de betametasona teve sua permeação aumentada em 80 vezes quando incorporado em uma nanoemulsão, em comparação a um creme comercial, e um aumento de cerca de 16% nas camadas mais profundas da pele quando comparado a uma pomada comercial. Assim, o sistema desenvolvido representa uma opção terapêutica promissora para o tratamento de psoríase.

Palavras chave: psoríase, dipropionato de betametasona, nanoemulsão, permeação cutânea.

ABSTRACT

Psoriasis is one of the most common worldwide dermatoses, which affects from 2 to 5% of the world population. It is a chronic and autoinflammatory disease of the skin that results in hyperproliferation and aberrant differentiation of keratinocytes. Its main pillar is the treatment with topical corticosteroid therapy, including betamethasone dipropionate, which, although it is a potent steroid, has limited absorption through the skin, which results in an important limitation in the success of the treatment. In order to overcome this limitation, this work proposed the development of a nanoemulsion incorporating betamethasone dipropionate. The nanoemulsion was developed through the construction of a phase diagram by spontaneous emulsification and the drug incorporated into the formulation under ultrasonication. The nanoemulsion was characterized by droplet size, polydispersity index (PDI), potential zeta, conductivity and pH. The formulation obtained an average droplet size of 23.5 ± 0.4 nm, $PDI = 0.20 \pm 0.01$, zeta potential = -4.2 ± 1.7 mV, conductivity of 47.1 μ S/cm and pH 6.0. An analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) was validated to quantify the drug, which was considered selective and linear. The absorption of betamethasone dipropionate through the skin was determined by an in vitro permeation test on porcine ear skin in "Franz"-type diffusion cells. The test was conducted for a period of 24 hours compared to a cream and ointment from the market. The permeation test demonstrated that the betamethasone dipropionate had its permeation increased in 80 times in the stratum corneum when incorporated in the nanoemulsion, compared to a commercial cream, and an increase of around 16% in the skin deeper layers when compared to a commercial ointment. In this way, the developed system represents a promising therapeutic option for the treatment of psoriasis.

Keywords: psoriasis, betamethasone dipropionate, nanoemulsion, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manifestações Clínicas	6
Figura 2. Manifestações clínicas da psoríase vulgar	7
Figura 3. Manifestações clínicas da psoríase gututa	7
Figura 4. Manifestações clínicas da psoriase eritrodérmica	8
Figura 5. Manifestações clínicas da psoríase palmo-planar	8
Figura 6. Manifestações de artrite psoriática, incluindo envolvimento das unhas.	9
Figura 7. Estrutura química do Dipropionato de Betametasona.	12
Figura 8. Anatomia da pele.	13
Figura 9. A estrutura da epiderme divide-se em camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e estrato córneo	14
Figura 10. Vias de permeação no estrato córneo. (A) A via transcelular. (B) A via intercelular. (C) via dos anexos cutâneos através de folículos capilares com glândulas sebáceas associadas e (D) por meio de dutos de suor.....	15
Figura 11. Orientação de moléculas de tensoativos em uma interface óleo-água. Os grupos de cabeças polares se orientam para a fase aquosa, enquanto os grupos de caudas apolares se orientam para a fase orgânica. Esse tipo de orientação reduz a tensão entre as duas interfaces, promovendo a miscibilidade.	18
Figura 12. Representação das NE do tipo A/O e O/A respectivamente.	18
Figura 13. Macroemulsão sendo convertida em nanoemulsão por aparelho de ultrassom.....	20
Figura 14. Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para a nanoemulsão contendo Dipropionato de Betametasona. Equação da reta para o gráfico: $y = 47926x - 24744$, $r^2 = 0,998$	28
Figura 15. Cromatograma referente à injeção da formulação e interferentes presentes no processo para aferir a seletividade da leitura do Dipropionato de Betametasona.	29
Figura 16. Diagrama de fases pseudoternário construído após a titulação ponto a ponto de diferentes concentrações dos componentes para desenvolvimento da nanoemulsão.....	31
Figura 17. Aspecto da formulação selecionada (A) antes e (B) após a incorporação do Dipropionato de Betametasona.....	33

Figura 18. Dipropionato de Betametasona recuperado do (A) estrato córneo e da (B) pele remanescente após um período de 24h de tratamento com a nanoemulsão e os controles (creme e pomada). Os (*) indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão de 3 determinações..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores teóricos calculados para o limite de detecção e limite de quantificação do método de quantificação de Dipropionato de Betametasona em metanol.	30
Tabela 2. Composição da formulação desenvolvida e selecionada para incorporação de Dipropionato de Betametasona.....	32
Tabela 3. Caracterização da formulação contendo o Dipropionato de Betametasona quanto ao tamanho da gotícula (nm), PDI, potencial zeta (-mV), pH e condutividade (uS/cm).	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
PDI	<i>Polydispersity index</i>
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivo específico	3
3	REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1	Psoríase	4
3.1.1	<i>Psoríase Vulgar ou Psoríase em Placas</i>	6
3.1.2	<i>Psoríase gutata</i>	7
3.1.3	<i>Psoríase eritrodérmica</i>	7
3.1.4	<i>Psoríase palmo-plantar</i>	8
3.1.5	<i>Artrite psoriática</i>	8
3.2	Abordagem terapêutica	9
3.2.1	<i>Fototerapia</i>	9
3.2.2	<i>Agentes sistêmicos</i>	10
3.2.2.1	<i>Acitretina</i>	10
3.2.2.2	<i>Metotrexato</i>	10
3.2.2.3	<i>Ciclosporina</i>	10
3.2.2.4	<i>Imunobiológicos</i>	11
3.2.3	<i>Agentes Tópicos</i>	11
3.2.3.1	<i>Análogos tópicos da vitamina D</i>	11
3.2.3.2	<i>Agentes Corticosteroides</i>	11
3.3	Estrutura da pele e permeação cutânea	12
3.4	Nanoemulsões	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Material	21
4.2	Validação do método analítico	21
4.2.1	Linearidade	21
4.2.2	Seletividade	22
4.2.3	Limite de detecção e limite de quantificação	22
4.3	Desenvolvimento das nanoemulsões	23
4.3.1	<i>Construção do diagrama de fases</i>	23
4.3.2	<i>Seleção da formulação</i>	24
4.3.3	<i>Incorporação de dipropionato de betametasona</i>	24
4.4	Caracterização da nanoemulsão	24

4.4.1	Potencial zeta	24
4.4.2	Tamanho de gotícula e PDI	25
4.4.3	Condutividade	25
4.4.4	Mensuração do pH.....	25
4.5	Ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i>	25
4.6	Análise dos dados	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	Validação do método.....	27
5.1.1	Linearidade	27
5.1.2	Seletividade	28
5.1.3	Limite de detecção e limite de quantificação	29
5.2	Obtenção das nanoemulsões.....	30
5.3	Caracterização das nanoemulsões.....	33
5.4	Ensaio de permeação <i>in vitro</i>.....	34
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, recorrente e de causa desconhecida, com envolvimento preferencial da pele caracterizada por hiperplasia epidérmica e ativação imune inapropriada (RAYCHAUDHURI, 2014). De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, mais de 5 milhões de adultos sofrem de psoríase, o que corresponde a aproximadamente 1-3% da população. Embora a etiologia da psoríase permaneça desconhecida, acredita-se que seja multifatorial com vários componentes-chave, incluindo suscetibilidade genética, gatilhos ambientais em combinação com rompimento da barreira cutânea e disfunção imunológica (RAYCHAUDHURI, 2014).

Embora a incapacidade física possa ser leve, o impacto psicológico da psoríase pode ser significativo, principalmente quando as mãos, o rosto ou a área genital são afetados. Está associada a uma alta incidência de depressão com ideação suicida e outras morbidades (PHILIP, 2010; RAYCHAUDHURI, 2014). Além disso, seu ônus é relatado como comparável a outras doenças crônicas, como diabetes e doenças cardíacas (PHILIP, 2010).

A doença leve é tipicamente tratada apenas com terapia tópica, o que é a realidade da maioria dos pacientes com psoríase. A doença moderada a grave geralmente é tratada com fototerapia, terapias sistêmicas ou agentes biológicos. No entanto, o uso de medicamentos orais como metotrexato, ciclosporina e acitretina, que são a base do tratamento sistêmico da psoríase, podem apresentar efeitos colaterais graves como teratogenicidade, hepatotoxicidade, mielo-supressão, insuficiência renal, reações cutâneas e infecções oportunistas, por afetarem o sistema imunológico (RAYCHAUDHURI, 2014; WARREN; CHALMERS; MENTER, 2008).

Como forma de contornar essa situação, o uso de terapia tópica em doenças moderadas a graves pode reduzir potencialmente a quantidade necessária de fototerapia ou agentes orais para alcançar um controle satisfatório da doença e reduzir efetivamente os quadros de efeitos adversos causados pelos medicamentos sistêmicos (UVA, 2012).

De longe, um dos agentes tópicos mais comumente utilizados em todos os graus de psoríase são os corticosteroides, entre eles esta o dipropionato de betametasona. Estes estão disponíveis em um número variado de apresentações e possuem efeitos imunossupressores, antiproliferativos e anti-inflamatórios que

consiste em vasoconstrição e expressão de lipocortinas em nível celular que inibem a fosfolipase A2, resultando em uma redução da formação de fatores pró-inflamatórios, o que os torna uma opção terapêutica vantajosa para doenças imunomediadas como a psoríase (HOEGSBERG, 2020). Entretanto, o dipropionato de betametasona apresenta uma baixa permeabilidade pela pele, o que é uma desvantagem importante na prática clínica, já que reduz a sua eficácia terapêutica no local alvo (BANGALE et al., 2012). Esta dificuldade está associada ao fato de se tratar de uma molécula muito lipofílica (Log P = 4,07) que tende a ficar concentrada na camada mais superficial e lipofílica da pele, o estrato córneo.

Tendências recentes no desenvolvimento de preparações tópicas mostram que grandes esforços têm sido direcionados para a melhoria de veículos e bases e também para novos métodos de aplicação tópica que superem a barreira da pele, com o objetivo de otimizar a eficácia clínica de inúmeros medicamentos, entre eles os corticosteroides (BHUTANI, 2012; TAKEDA et al. 1977).

Uma das técnicas que tem particularmente despertado interesse por demonstrar melhores resultados é a utilização de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia (*Nano Drug Delivery System* - NDDS). As nanoemulsões (NE) se destacam neste campo por serem sistemas coloidais estáveis que são compostos por água e óleo, estabilizados entre si por um filme de tensoativos. A tecnologia de NE tem sido bem-sucedida em superar a barreira do estrato córneo, aumentando a biodisponibilidade e a permeabilidade do fármaco pela barreira da pele, e ainda exibindo um perfil mínimo de toxicidade, tornando-a desejável como veículo de fármacos pouco permeáveis como é o caso do dipropionato de betametasona (SINGH, 2013).

Com foco nisso, este estudo propõe desenvolver e caracterizar uma formulação nanoemulsionada contendo o dipropionato de betametasona, e testá-la quanto a sua penetrabilidade na pele de forma comparativa à outras formulações disponíveis no mercado contendo este mesmo fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma NE contendo dipropionato de betametasona e avaliar a sua permeação na pele em comparação à outras formulações disponíveis no mercado contendo este ativo, com o propósito de oferecer uma alternativa terapêutica inovadora para o tratamento de psoríase.

2.2 Objetivo específico

- Desenvolver nanoemulsão incorporando dipropionato de betametasona;
- Caracterizar a nanoemulsão quanto ao tamanho da gotícula, ao índice de polidispersão (PDI), ao potencial zeta, à condutividade e ao pH;
- Avaliar a permeação *in vitro* do dipropionato de betametasona em pele suína a partir da nanoemulsão em comparação a formulações comerciais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Psoríase

A psoríase (do grego "psora" = "sarna" ou "erupção cutânea"), é uma doença cutânea crônica imunomediada que por mais de mil anos foi confundida com a hanseníase, somente sendo diferenciada na década de 1840. Considerada uma das dermatoses mais comuns, a psoríase afeta em torno de 1-3% da população brasileira e 125 milhões de pessoas no mundo. Em geral acomete pessoas em qualquer idade, mas é mais comum em adultos, embora o acometimento antes dos 40 anos esteja relacionado a quadros clínicos mais graves (Al-SHOBAILI & QURESHI, 2013). O Ministério da Saúde (2018) define a psoríase como uma doença crônica, sistêmica e inflamatória que afeta a pele, sem mucosas e, em alguns casos, as articulações. Apresenta origem imunológica e predisposição genética, porém a influência de múltiplos fatores ambientais pode levar ao desenvolvimento ou à piora da doença.

Pacientes com psoríase, assim como aqueles com outras doenças crônicas importantes, costumam apresentar consequências significativas como a redução da expectativa e da qualidade de vida, bem como estigma da doença, afetando as relações sociais, de emprego e renda, sendo incapacitante em casos graves, além de traços depressivos na grande maioria - seu ônus psicológico é comparado a outras doenças importantes como o câncer e diabetes (GISONDI, 2013).

Os fatores postulados que estão envolvidos na etiologia da psoríase são complexos. Além dos fatores endógenos, como os fatores imunológicos, existem também fatores exógenos, como os gatilhos ambientais.

O papel do sistema imune na causa da psoríase é um tópico importante de pesquisas. Embora exista uma sugestão de que a psoríase possa ser uma doença autoimune, ainda não foi identificado nenhum autoantígeno que possa ser responsável (BOEHNCKE, 2015). Apesar disso, os avanços nas técnicas imunológicas e nas análises genéticas das últimas décadas ajudaram a esclarecer melhor alguns pontos da fisiopatologia envolvida na psoríase, sendo semelhante a outras doenças mediadas por imunidade, como a doença de Crohn, artrite reumatoide e esclerose múltipla. Tudo isso se encaixa na definição de uma doença autoimune como "uma síndrome clínica causada pela ativação de células T, células B ou ambas, na ausência de uma infecção em andamento ou outra causa discernível" (MATTOZZ

et. al. 2012). Um conjunto de anormalidades observadas na psoríase, como níveis aumentados de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ligação do receptor do fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e presença de neutrófilos no estrato córneo, coletivamente apontam para uma perturbação na função das células T sobre as células epidérmicas, e reforçam a visão de uma doença imunomediada (MAHAJAN, HANDA, 2013).

Já dentre os fatores exógenos, o principal gatilho ambiental é o estresse psicológico, citado por quase 90% dos pacientes como um fator importante para a manifestação do seu quadro clínico. Outros fatores importantes são: lesão mecânica e química; uso de medicamentos como betabloqueadores e anti-inflamatórios não esteroidais; hábito de fumar; e várias infecções, sendo que a mais importante delas é a infecção por estreptococos do grupo A. *Streptococcus pyogenes* (AL -SHOBAILI, & QURESHI, 2013).

Fisiopatologicamente a psoríase caracteriza-se pela proliferação exacerbada e desordenada das células epidérmicas o que resulta em espessamentos proeminentes da epiderme, que são descritos como placas vermelhas, na maior parte simétrica, nitidamente demarcada, e normalmente recoberta por escamações brancas. Na placa psoriática ocorre dilatação vascular acentuada e os capilares prolongam-se para a base da epiderme o que intensifica a vermelhidão visível nas lesões. Os queratinócitos incompletamente diferenciadas, que ocorrem na psoríase, perdem a capacidade normal de secretar a matriz lipídica e, conseqüentemente, empilhar-se e aderir-se uns aos outros, o que é a causa da descamação característica da doença (ESTEVES, 2013; MAHAJAN, HANDA, 2013).

O envolvimento cutâneo é muito variável (Figura 1), podendo manifestar-se em qualquer local do corpo, com preferência pelos joelhos, cotovelos, couro cabeludo e genitais (GISONDI, 2013).

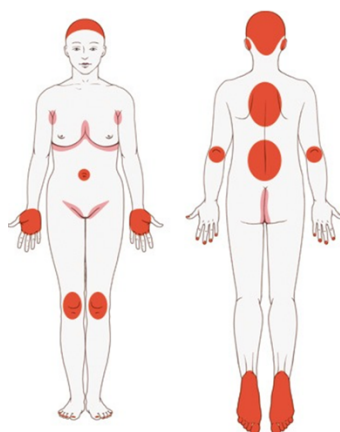


Figura 1. Manifestações Clínicas (PSORÍASE: OVERVIEW, 2017)

Segundo Pariser (2015) a psoríase envolve preferencialmente a pele, mas pode afetar também as unhas e as articulações, e está associada a uma diversidade de comorbidades. Entre 1,3% e 34,7% dos indivíduos com psoríase desenvolvem artrite inflamatória crônica (artrite psoriática), que leva a deformações articulares e incapacidade. Entre 35% e 50% de todos os pacientes que sofrem de psoríase desenvolvem alterações ungueais. Relata-se que os indivíduos com psoríase apresentam um maior risco de desenvolver outras condições clínicas sérias, tais como doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e outras doenças não transmissíveis (BOEHNCKE, 2015, AUGUSTIN et. al, 2015).

A psoríase se manifesta de diferentes formas, entender suas características ajuda a determinar o melhor tratamento. Cinco são as mais prevalentes: psoríase vulgar ou em placas, psoríase gutata, psoríase eritrodérmica, psoríase palmo-plantar e artrite psoriática.

3.1.1 Psoríase Vulgar ou Psoríase em Placas

A forma clínica mais frequente de psoríase, a psoríase vulgar (Figura 2), constitui quase 90% dos casos. Clinicamente observam-se placas eritematosas, com espessamento, descamação, cobertas com escamas peroladas e distribuídas simetricamente com diâmetros variando de milímetros a vários centímetros. Podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas são mais frequentemente localizadas nos joelhos, cotovelos, couro cabeludo e região sacral (BOEHNCKE, 2015, GUDJONSSON, 2008).



Figura 2. Manifestações clínicas da psoríase vulgar (ARMSTRONG, 2020).

3.1.2 Psoríase gutata

Este tipo de psoríase é frequentemente visto em crianças e adultos jovens. As lesões se manifestam com uma aparência avermelhada em formato semelhante a pequenas gotas (Figura 3), manifestando-se geralmente após infecções estreptocócicas. As lesões geralmente são vistas no tronco, braços e coxas (RODRIGUES, 2009, MARQUES PINTO, 2012).



Figura 3. Manifestações clínicas da psoríase gutata (National Psoriasis Foundation/USA, 2019).

3.1.3 Psoríase eritrodérmica

As lesões psoriáticas afetam quase 80% da superfície do corpo nessa forma generalizada de psoríase (Figura 4). Lesões predominantemente eritematosas com descamações finas, pápulas e as placas típicas perdem suas características, podendo ser confundidas com queimaduras. Pode-se observar hipotermia devido à vasodilatação generalizada e um prejuízo significativo na função barreira da pele (SARAC; et al 2016, KIM et al 2016).



Figura 4. Manifestações clínicas da psoríase eritrodérmica (National Psoriasis Foundation/USA, 2019).

3.1.4 Psoríase palmo-plantar

A psoríase palmo-plantar afeta caracteristicamente a pele das palmas das mãos e plantas dos pés (Figura 5). Apresentam-se como fissuras, podendo ocorrer, em alguns casos, o aparecimento de pequenas pústulas estéreis (MICELI; SCHMEIDER, 2017).



Figura 5. Manifestações clínicas da psoríase palmo-planar (B RZANY, 2000).

3.1.5 Artrite psoriática

A prevalência geral de artrite psoriática (Figura 6) varia entre 0,02 e 0,1% na população em geral, enquanto sua prevalência varia entre 1,3% e 34,7% entre os pacientes com psoríase. Nesta artrite a inflamação psoriática acomete as articulações de forma crônica e caracteriza-se por rigidez, dor e inchaço, podendo levar a deformidades – em alguns casos permanentes (SUNDARRAJAN, 2016; ARMSTRONG, 2020).



Figura 6. Manifestações de artrite psoriática, incluindo envolvimento das unhas (ARMSTRONG, 2020).

3.2 Abordagem terapêutica

O tratamento da psoríase depende da forma clínica da doença, da gravidade e da extensão, da idade, do sexo, e das condições do paciente, em relação à saúde geral e situação sócio econômica. Também deve ser levado em conta o que a psoríase representa no comprometimento da qualidade de vida do paciente. Os quadros clínicos mais localizados podem ser responsáveis por comprometer vários aspectos da vida do paciente, se situados, por exemplo, nas mãos, nos genitais e na face. Os quadros leves, sem comprometimento da qualidade de vida, podem ser tratados apenas com medicações tópicas. Estas costumam ser utilizadas também como adjuvantes da fototerapia ou da medicação sistêmica nos quadros graves (PSORÍASE BRASIL, 2017, SBD, 2016).

3.2.1 Fototerapia

A fototerapia é um tratamento efetivo de primeira linha para psoríase em placas moderada a grave que atua inibindo a proliferação de queratinócitos, promovendo seu apoptose e atenuando as vias inflamatórias Th1 e Th17. Pode desempenhar um papel no manejo em longo prazo da psoríase quando o curso da doença se torna mais estável (RACZ, 2015).

É uma opção terapêutica indicada de modo isolado ou associada a vários outros medicamentos tópicos e/ou sistêmicos, com o objetivo de controle rápido da doença e de diminuir doses de medicamentos (RACZ, 2015).

3.2.2 Agentes sistêmicos

Em geral, a maioria dos pacientes tem melhora clínica apenas com o uso de medicamentos tópicos e fototerapia, porém cerca de 20% necessitam fazer o uso de medicamentos sistêmicos. Estes por sua vez, apesar de serem mais efetivos, apresentam um potencial importante para efeitos colaterais sérios como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade, o que restringe o seu uso a longo prazo (BOS, 2004).

3.2.2.1 *Acitretina*

Retinoide de segunda geração, a acitretina é um tratamento de primeira linha para a psoríase moderada a grave e outros distúrbios hiperqueratóticos. Eles atuam normalizando a proliferação e diferenciação de queratinócitos, regulando a atividade das glândulas sebáceas e modulando respostas inflamatórias locais (KAPLAN, 2015). Os efeitos colaterais são dose-dependentes e incluem descamação da pele, queilite, xerose, prurido e perda de cabelo. Os retinoides também são conhecidos por serem potentes teratógenos; portanto, o uso desses agentes em mulheres com potencial para engravidar é fortemente regulamentado (KAPLAN, 2015).

3.2.2.2 *Metotrexato*

O metotrexato é um medicamento imunossupressor que inibe a enzima diidrofolato redutase, que é essencial na biossíntese do DNA. A terapia sistêmica oral com metotrexato é uma opção de primeira linha para pacientes com psoríase em placas que têm falha no controle da doença com terapia tópica. O metotrexato, assim como a acitretina, o tem um início de ação mais lento e é considerado um agente de alta prioridade para casos mais estáveis de psoríase eritrodérmica. O uso prolongado de metotrexato pode causar estomatite ulcerativa, fibrose hepática e supressão da medula óssea (MAHMOOD 2015).

3.2.2.3 *Ciclosporina*

A ciclosporina é um agente imunossupressor que bloqueia a transcrição de IL-2, assim interferindo no crescimento e na atividade das células-T. Devido ao seu rápido início de ação, a ciclosporina é considerada um medicamento de primeira linha para o controle de casos instáveis de psoríase eritrodérmica, psoríase vulgar grave e

usada em caso de não responsividade à metotrexato ou retinoides. O uso prolongado pode causar disfunção renal, anorexia e hipertensão (MARQUELING, 2013).

3.2.2.4 *Imunobiológicos*

Essa terapia biológica engloba uma categoria emergente de drogas que visam citocinas específicas do sistema imunológico. Dada a sua maior seletividade e por possibilitar um maior período de remissão do quadro clínico, esses agentes são uma alternativa promissora aos imunossupressores convencionais, como o metotrexato e a ciclosporina. As categorias de fármacos biológicos foram adotadas para o tratamento de psoríase, inclui os inibidores de TNF- α , os inibidores de IL-12 / IL-23 e, mais recentemente, os inibidores de IL-17. Os principais efeitos adversos comuns a todas as classes de imunobiológicos são nasofaringite e infecções do trato respiratório superior (FOTIADOU, 2014).

3.2.3 **Agentes Tópicos**

Com o desenvolvimento de terapias mais potentes e direcionadas, o uso de tópicos em psoríase tornou-se menos comum. No entanto, eles continuam sendo o pilar do tratamento de pacientes com quadro leve ou como terapia adjunta para lesões recalcitrantes em quadros mais graves (SINGH et. al. 2016). Para estes casos, o uso de análogos tópicos de vitamina D e de esteroides tópicos de potência média foram relatadas na literatura (VADYA, LEWALLEN, FELDMAN 2015).

3.2.3.1 *Análogos tópicos da vitamina D*

Análogos tópicos da vitamina D incluem uma terapia de primeira linha para a psoríase em placas leve a moderada, devido à sua capacidade de inibir a proliferação celular, aumentar a diferenciação celular e modular os fatores imunológicos envolvidos na etiologia da doença (MUMOLI 2014). O calcipotriol e o calcitriol geralmente não devem ser usados em situações em que os pacientes têm alto risco de absorção sistêmica, como em psoríases graves (CONTI, 2013).

3.2.3.2 *Agentes Corticosteroides*

Dentre os esteroides de uso tópico, está o Dipropionato de Betametasona, um agente corticosteroide sintético, agonista do receptor de glicocorticoide altamente potente que possui efeitos imunossupressores, anti-inflamatórios, antiproliferativos e

vasoconstritor. Seu mecanismo de ação se dá pela expressão de lipocortinas a nível celular, molécula capaz de inibir a fosfolipase A2 que de modo posterior leva à inibição da síntese do ácido araquidônico e diminui a biossíntese de prostaglandinas, quininas, histaminas, sistema de complemento e leucotrienos (BANGALE et al., 2012; COLOMBO et al., 2012). Pode ser encontrado em diversas formulações como pomada, creme, loção e espuma, sendo indicados para o tratamento da psoríase leve a moderada (BANGALE et al., 2012; COLOMBO et al., 2012).

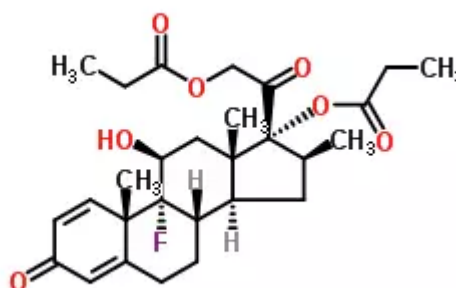


Figura 7. Estrutura química do Dipropionato de Betametasona.

Embora o uso de corticosteroide tópico seja considerado altamente eficaz e seguro inicialmente, em que se observa uma rápida melhora das lesões, ele pode levar ao desenvolvimento de taquifilaxia, que é uma resposta rapidamente decrescente a doses sucessivas de fármaco tornando-o menos eficaz com o uso prolongado, portanto, seu uso não deve ser superior a períodos de 2 semanas. Além disso, seu uso por longos períodos pode causar estrias e afinamento da pele (MALIK et al. 2015).

Ainda, seu uso clínico apresenta algumas desvantagens práticas, como a baixa permeabilidade pela pele, o que reduz a sua eficácia terapêutica no local alvo. A principal limitação está na função de barreira da pele, considerada um dos epitélios mais impermeáveis do corpo humano para substâncias exógenas (BANGALE et al., 2012; COLOMBO et al., 2012).

3.3 Estrutura da pele e permeação cutânea

A pele humana, cobertura externa do corpo, é o seu maior e mais complexo órgão, que protege e, ao mesmo tempo, permite a interação com o ambiente. Está dividida em três camadas principais (Figura 8): epiderme, derme e hipoderme, sendo que cada uma se complementa em papéis distintos das funções gerais da pele de barreira à permeabilidade, proteção à agentes infecciosos, proteção ultravioleta (UV),

sensação e termorregulação. A epiderme, a camada mais externa, varia em espessura em diferentes regiões do corpo, é mais fina nas pálpebras (0,05 mm) e mais espessa nas palmas das mãos e nas solas dos pés (1,5 mm); Esta primeira camada fornece um importante papel na função de barreira física da pele, juntamente com a sua camada inferior, a derme, uma camada bem vascularizada e rica em terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A derme está ligada à hipoderme subjacente ou tecido conjuntivo subcutânea, uma camada de gordura e tecido conjuntivo que abriga vasos sanguíneos e nervos maiores. Esta camada é importante na regulação da temperatura da própria pele e do corpo e fornece grande parte da integridade estrutural da pele (TABASSUM, 2014).

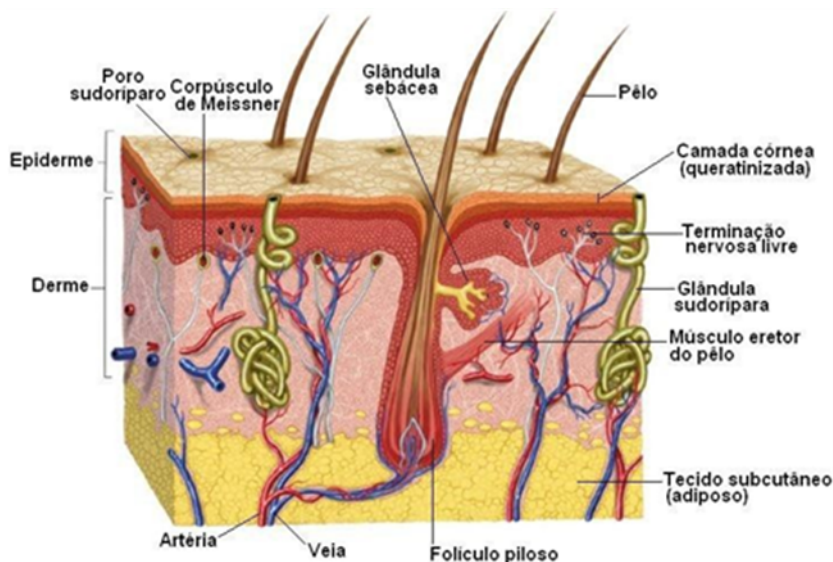


Figura 8. Anatomia da pele (MARIEB, 1997).

A epiderme é a camada avascular da pele e a mais externa do corpo. É composta por quatro camadas: estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal como ilustrado na Figura 9 (HARRIS, 2009). Está separada da derme por sua última camada, a membrana basal ou germinativa, onde suas células são do tipo estratificado, de forma pavimentosa. As duas camadas intermediárias são constituídas por células vivas e nucleadas da epiderme. Essas células diferenciam-se progressivamente até terem suas organelas dissolvidas e perderem o núcleo, tornando-se impermeáveis em razão de sua camada superficial morta, queratinizada e dispersa em uma matriz rica em lipídios, denominada como capa córnea, onde suas células podem se apresentar de forma compacta ou em disjunção (BORGES, 2010).

Em seres humanos, o tempo normal para uma célula basal alcançar o estrato córneo e posterior descamação é de pelo menos 28 dias. Esse intervalo de tempo é encurtado significativamente na psoríase, em que há um quadro de hiperproliferação – o ciclo de diferenciação tem redução de 8 vezes e a célula chega ao estrato córneo em apenas 4 dias (CHU D, 2008).

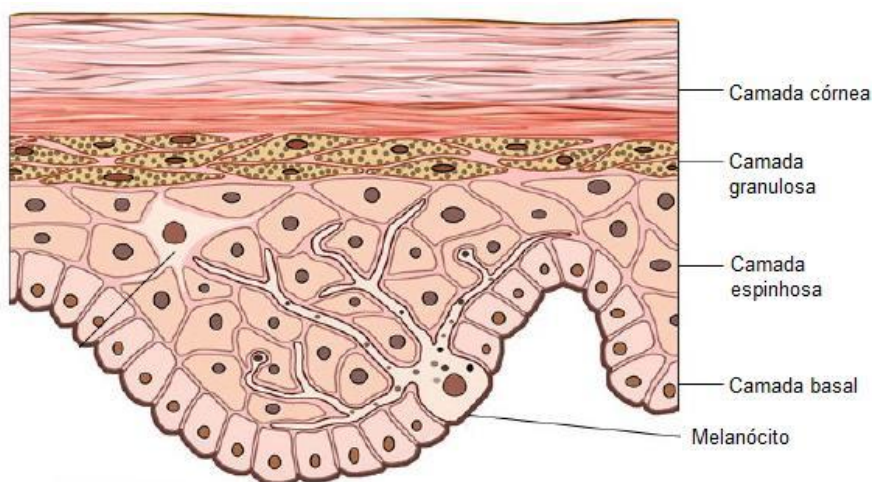


Figura 9. A estrutura da epiderme divide-se em camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e estrato córneo (LOWES M, 2007).

A eficácia desejada da formulação tópica antipsoriática aplicada sobre a pele dependerá da sua permeação através do estrato córneo, que, de fato, constitui a etapa limitante desse processo. O modelo de dois compartimentos do estrato córneo como uma barreira, aceito atualmente, demonstra a complexidade da permeação, já que o fármaco deve interagir com o material cornificado dos queratinócitos, com o material lipídico intercelular ou com ambos. Portanto a efetiva permeação através do estrato córneo exige do fármaco uma série de propriedades físico-químicas, o que na prática acaba restringindo o número de moléculas suscetíveis (MAHAJAN, R; 2013).

O transporte de fármacos através da pele pode ser realizado através de três vias potenciais como ilustra a Figura 10: anexos cutâneos, como dutos de suor, folículos capilares e glândulas sebáceas associadas (via anexos cutâneos) ou através do estrato córneo contínuo (via transepidérmica). No que diz respeito a este último, podem existir duas vias específicas através do estrato córneo intacto: a via lipídica intercelular entre os corneócitos e a via transcelular através dos corneócitos e lipídios de intercalação (SHAKER, 2019).

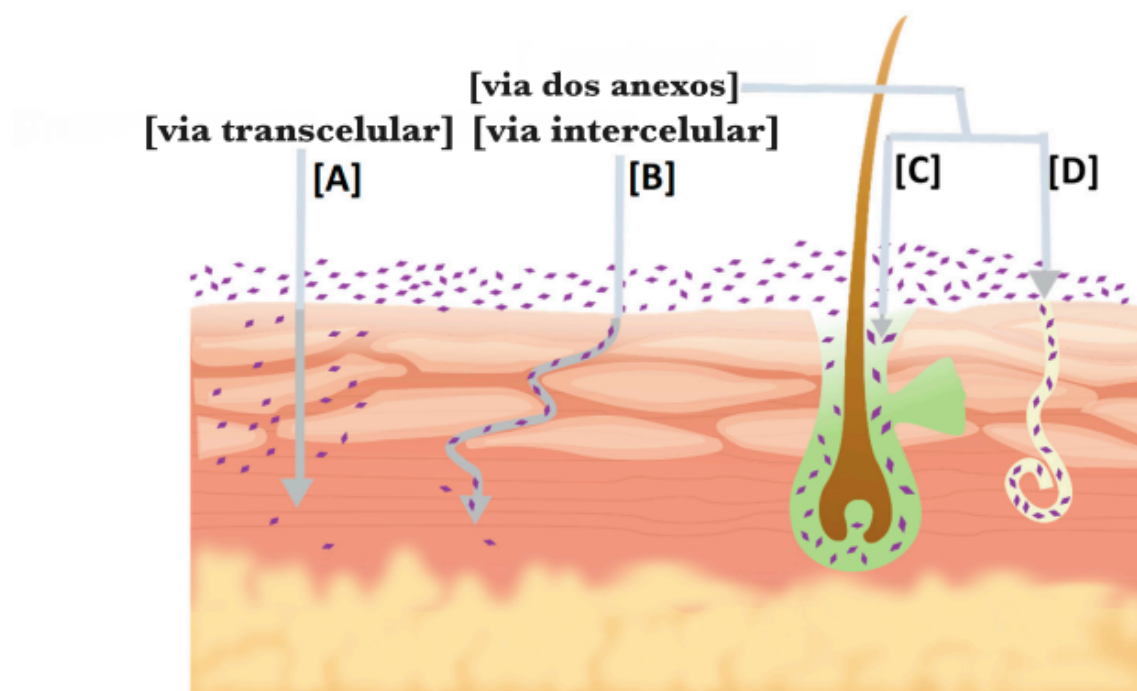


Figura 10. Vias de permeação no estrato córneo. (A) A via transcelular. (B) A via intercelular. (C) via dos anexos cutâneos através de folículos capilares com glândulas sebáceas associadas e (D) por meio de dutos de suor (adaptado de SHAKER, 2019).

Deve-se notar que essas vias não são mutuamente exclusivas, ou seja, um medicamento pode usar mais de uma via de permeação, o que dependerá de suas propriedades físico-químicas. A rota transcelular tem sido considerada como uma rota polar através do estrato córneo, uma vez que os corneócitos contêm uma matriz de queratina intracelular que é relativamente hidratada, ou seja, de natureza polar. Porém, a permeação requer particionamento consecutivo entre esse ambiente polar e os domínios lipofílicos envolvendo os corneócitos (BENSON et al., 2011). Portanto, essa é uma via preferencial para compostos hidrofílicos, apesar da necessidade do permeante de atravessar os lipídios intercelulares, a fim de saltar de um corneócito para outro (BOLZINGER, 2012).

Embora a transcelular seja a rota mais direta, o transporte é predominantemente realizado pela via intercelular, que fornece a única rota contínua através do estrato córneo. Nesse caso, o comprimento do caminho é muito maior que a espessura simples do estrato córneo (10-15 μm), uma vez que os domínios intercelulares são altamente tortuosos e podem exceder 150 μm . Dentro dos espaços intercelulares, uma molécula difusora deve atravessar uma variedade de domínios

lipofílicos (via núcleo lipídico) e hidrofílicos (via grupos polares da cabeça) dos lipídios estruturados (SHAKER, 2019).

Apesar dos anexos (glândulas e folículos capilares) terem sido considerados acessos de baixa resistência, sua contribuição foi estimada como pequena, uma vez que representam apenas 0,1-1% da área total da superfície da pele. Entretanto, sugere-se que a via dos anexos cutâneos domine durante a permeação de moléculas e íons polares grandes (PROW et al., 2011).

Várias maneiras têm sido propostas para romper a barreira do estrato córneo e esses métodos são amplamente classificados como métodos ativos e passivos. A classe anterior utiliza fontes externas de energia, como iontoforese, sonoforese, microagulhas, eletroporação para romper temporariamente a barreira da pele, enquanto a última classe utiliza intensificadores de permeação química e líquidos iônicos, entre outros (LIU et al., 2017; AGATEMOR, 2018).

A técnica de modificação do tamanho das partículas do fármaco para o tamanho nano é um método passivo que propõe superar a barreira do estrato córneo, aumentando a biodisponibilidade e a solubilidade do fármaco. Já está demonstrado que as nanoemulsões - quando comparadas a formulações tópicas convencionais - promovem o melhoramento da permeação de inúmeras moléculas (SINGH, 2013). Algumas hipóteses são levantadas para esclarecer os mecanismos pelo qual as nanoemulsões promovem o aumento da permeação transdérmica, conforme sugerido por SHAKER, (2019):

- (A) Aumento da atividade termodinâmica do medicamento: a nanoemulsão, por ter uma alta taxa de solubilização, induziria um aumento da atividade termodinâmica do fármaco incorporado a si. Neste sistema a molécula tem alta energia de mobilidade entre as fases da nanoemulsão, o que facilitaria a sua partição no processo de permeação.
- (B) Aumento da atividade termodinâmica em relação a pele: a volumosa quantidade de medicamento incorporada à formulação causaria à pele um aumento da sua atividade termodinâmica, induzindo a um aumento da permeação do fármaco.
- (C) Redução da barreira difuncional do estrato córneo: Acredita-se que os componentes surfactantes das nanoemulsões possam interromper a

propriedade de barreira do estrato córneo através da dissolução da matriz lipídica, induzindo vias aumentadas de permeação para o fármaco.

Vários estudos têm levantado diversas outras hipóteses: a solubilização do sebo dos orifícios foliculares pelos surfactantes das nanoemulsões e maior dispersão pelo aumento da área de superfície de contato pelo nanodimensionamento da fase interna da nanoemulsão (SHAKER, 2019).

3.4 Nanoemulsões

A terapia tópica é um tratamento de primeira linha e é o método de tratamento mais prático para pacientes com psoríase. No entanto, os tratamentos tópicos convencionais, com pomadas e cremes, apresentam uma baixa permeabilidade através da pele como uma limitação importante na prática clínica, levando a baixa eficácia do fármaco. Enquanto a fototerapia e tratamento sistêmico produzem efeitos adversos significativos. Como forma de superar isso, há um interesse crescente no uso de nanoemulsões em aplicações tópicas, que vem apresentando resultados promissores para o tratamento de inúmeras disfunções dermatológicas (BANGALE et al., 2012).

Nanoemulsão é definida como um sistema de emulsão que consiste em óleo e água dispersos entre si por tensoativos (Figura 11). A principal diferença entre emulsão e nanoemulsão está no tamanho e na forma das gotículas dispersas na fase contínua. O tamanho da gotícula da nanoemulsão é definido como inferior a 200 nm. No entanto, se a emulsão tiver baixo conteúdo de tensoativos e for cineticamente estável, um tamanho inferior a 500 nm poderá ser aceito como nanoemulsão. Esse pequeno tamanho torna as gotículas de nanoemulsões menores que o comprimento de onda da luz visível, e por isso, são sistemas transparentes (SINGH, 2013; JAISWAL, 2015).

Portanto, quando a fase dispersa está na forma de nanogotículas, obtida através de uma combinação com rica quantidade de tensoativos/co-tensoativo, obtem-se um sistema heterogêneo, com aparência isotrópica, translúcido e cineticamente estável (sem floculação ou coalescência aparente durante o armazenamento em longo prazo) (SHAKEEL, 2012; SOOD, 2014).

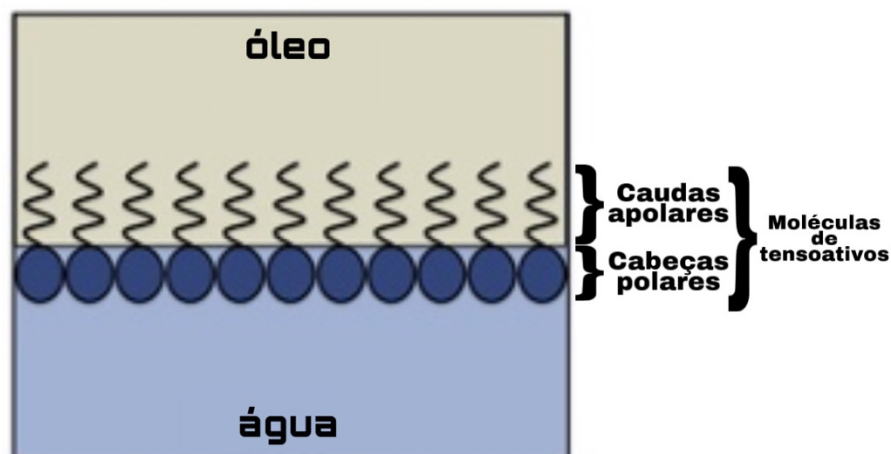


Figura 11. Orientação de moléculas de tensoativos em uma interface óleo-água. Os grupos de cabeças polares se orientam para a fase aquosa, enquanto os grupos de caudas apolares se orientam para a fase orgânica. Esse tipo de orientação reduz a tensão entre as duas interfaces, promovendo a miscibilidade (adaptado de CALLENDER S, 2017).

Em geral, as nanoemulsões se classificam como: óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). Nas emulsões O/A as gotículas de óleo estão dispersas em uma fase contínua de água, enquanto nas emulsões A/O as gotículas de água estão dispersas em uma fase contínua de óleo. Os dois tipos de nanoemulsões são mostrados na Figura 12. As nanoemulsões também podem ser preparadas como emulsões múltiplas. Em particular, existem emulsões óleo em água em óleo (O/A/O) e água em óleo em água (A/O/A). Emulsões múltiplas são frequentemente usadas em formulações de liberação retardada ou controlada (CALLENDER, 2017).

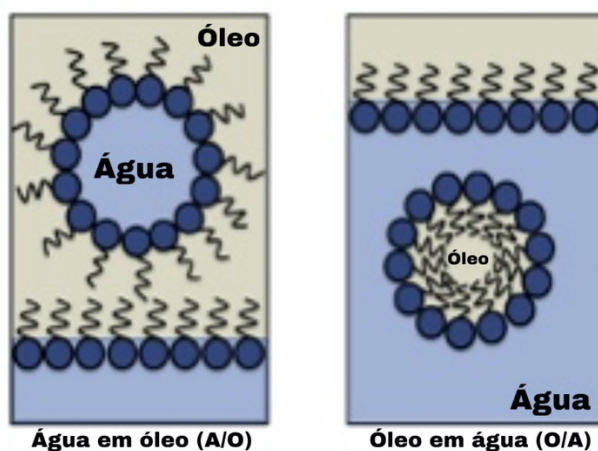


Figura 12. Representação das NE do tipo A/O e O/A respectivamente (CALLENDER S, 2017).

Os sistemas de nanoemulsões oferecem várias vantagens para a administração tópica de fármacos, incluindo baixa irritação da pele, tamanho controlado de gotículas – e, portanto, maior estabilidade, capacidade de dissolver eficientemente medicamentos lipofílicos, liberação prolongada de medicamentos lipofílicos e hidrofílicos, além de aumentar a hidratação e a viscoelasticidade da pele. A administração tópica de medicamentos também oferece as vantagens da adesão do paciente, facilidade de administração do medicamento e prevenção do metabolismo de primeira passagem (TADIVÉE, 2012; ROSEN & KUNJAPPU, 2012).

Considerando esses benefícios, foram relatados vários estudos sobre nanoemulsões como veículo tópico de fármacos. As nanoemulsões têm apresentado melhores resultados na administração tópica *in vitro* e *in vivo* na permeação transdérmica de fármacos antipsoriáticos (por exemplo, ácido 5-aminolevulínico e paclitaxel) do que em comparação às formulações tópicas convencionais (ZHANG et al., 2011).

Sendo sistemas termodinamicamente instáveis, o método de preparação tem grande influência na estabilidade da nanoemulsão. Atualmente, os métodos de preparo são classificados em métodos de alta energia, em que há necessidade de um aparelho sofisticado – como o ultrassom, e métodos de baixa energia, onde a emulsificação ocorre pela alteração da própria energia química dos componentes do sistema – como a emulsificação espontânea (SOLANS et al., 2005).

Nos métodos de alta energia são as forças mecânicas que quebram gotículas grandes em nanogotículas: quanto maior a força utilizada durante o processo, menor será o tamanho de gotícula (GONÇALVES et al., 2018). Entre os métodos de alta energia o mais preferível é o de emulsificação ultrassônica, em termos de operação e limpeza. Nesse método, as sondas do aparelho emitem ondas ultrassônicas que promovem a emulsificação pelo processo de cavitação acústica - fenômeno de formação e colapso de microbolhas, causadas pelas oscilações de pressão geradas pelas ondas acústicas (Figura 13). A turbulência causada pelo colapso das microbolhas promove a formação nanogotículas (KUMAR et al., 2019). Ao variar o tempo de sonicação, amplitude acústica e volume de processamento, é possível obter o tamanho de partícula desejado (LI et al., 2017).

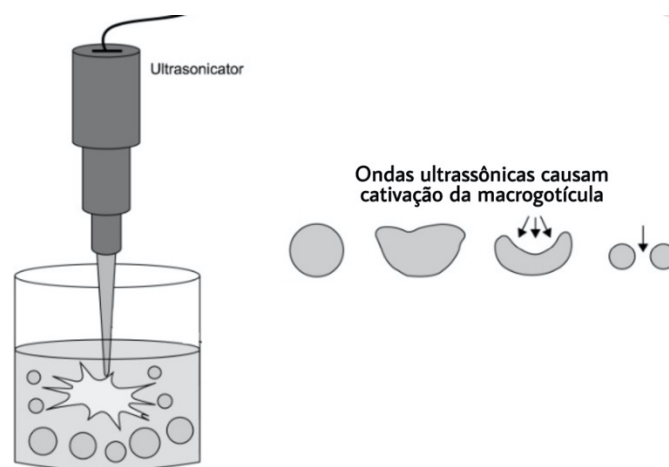


Figura 13. Macroemulsão sendo convertida em nanoemulsão por aparelho de ultrassom (KUMAR et al., 2019).

Já os métodos de baixa energia são desejáveis por produzirem nanoemulsões com a utilização de equipamentos mais simples, podendo ser geradas pela simples agitação dos componentes da formulação. Apesar de ser energeticamente vantajoso, uma desvantagem é que algumas vezes há necessidade de maiores quantidades de tensoativos para obter nanogotículas por esses métodos (SOLANS, 2012). O principal exemplo é o método de emulsificação espontânea em que a fase orgânica, contendo o óleo e o tensoativo lipofílico, é injetada na fase aquosa, contendo água e tensoativo hidrofílico, sob agitação magnética constante (SOLANS et al., 2005; TADROS et al., 2004).

Lançando mão dessa nova abordagem terapêutica, as nanoemulsões serão utilizadas nesse trabalho para incorporar o Dipropionato de Betametasona, com o objetivo de melhorar a sua capacidade de permeação nos anexos cutâneos e, assim, apresentar uma alternativa mais eficaz para o tratamento da psoríase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O dipropionato de betametasona foi fornecido pela Aché (São Paulo, Brasil). As nanoemulsões foram preparadas com óleo mineral obtido da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), Tween 80 obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Plurol® oleique gentilmente fornecido pela Gatefossè (França). Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, foi utilizado metanol e acetonitrila grau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) fornecidos pela J.T.Baker (Philisburg, Estados Unidos). Na técnica de tape stripping foram utilizadas fitas adesivas (n° 845) adquiridas da 3M (Saint Paul, Estados Unidos). Para preparo do tampão fosfato pH 7,4, o fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monohidratado foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), as correções do pH foram realizadas com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2 Validação do método analítico

O método foi validado de acordo com a RE N° 899 de 2003 da ANVISA com relação à seletividade, linearidade e limites de detecção e quantificação.

4.2.1 Linearidade

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução estoque de dipropionato de betametasona em metanol na concentração de 100 µg/mL. Em seguida foram preparadas 8 amostras diluídas em metanol a partir desta solução, em que as seguintes concentrações foram obtidas: 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10,0 µg/mL, 15,0 µg/mL e 20,0 µg/mL.

As amostras foram injetadas, posteriormente, em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para análise em triplicata, em que o metanol foi utilizado como branco. A partir da área do pico fornecida pelo equipamento em relação a concentração das amostras, as curvas analíticas foram plotadas e os dados

analisados pelo método de regressão linear através de uma reta no formato $y = ax + b$. Foi calculado, também, o coeficiente de correlação linear (r^2) que, de acordo com ANVISA, deve ser maior que 0,99 para que a curva tenha uma qualidade considerada aceitável.

4.2.2 Seletividade

A determinação da seletividade do dipropionato de betametasona em relação a contaminantes tanto da formulação quanto da pele sucedeu-se pela injeção em sextuplicata ao CLAE das cinco amostras seguintes: 1ª: Dipropionato de Betametasona, 2ª: Nanoemulsão + Dipropionato de Betametasona, 3ª: Dipropionato de Betametasona + Estrato córneo, 4ª: Dipropionato de Betametasona + Pele remanescente e 5ª: Tampão fosfato pH 7,4.

Para a obtenção das amostras foi preparada uma solução mãe (100 µg/mL) de dipropionato de betametasona diluído em metanol. Em seguida as 5 amostras foram diluídas em metanol a partir desta solução em que todas as concentrações finais obtidas foram de 10 µg/mL. À 1ª amostra foi adicionada somente a solução mãe e diluída com metanol. À 2ª foi adicionado 500 µL da NE. À 3ª foi adicionado o estrato córneo da pele da orelha de suíno, retirado com o auxílio de 10 fitas adesivas (*tape stripping*), e levado para agitação magnética por 24h junto ao metanol. À 4ª foi adicionada a pele remanescente da pele da orelha de suíno picotada, e levada para agitação magnética por 24h junto ao metanol. À 5ª foi adicionado 500 µL de tampão fosfato pH 7,4.

Os picos obtidos foram avaliados quanto ao seu tempo de eluição de forma comparativa a do fármaco para garantir que não houvesse interferentes no seu pico.

4.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do método foi calculado pela fórmula abaixo, representa a menor concentração que pode ser detectada, sem necessariamente ser quantificada, do dipropionato de betametasona:

$$LD = \left(\frac{3 \times s}{S} \right)$$

onde: (s) é o Desvio Padrão médio dos valores de intercepção do eixo y das curvas de calibração; e (S) é o coeficiente angular da equação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação indica qual o menor valor de quantificação que pode ser determinado pelo método de forma precisa e exata. Foi calculado pela fórmula abaixo:

$$LQ = \left(\frac{10 \times s}{S} \right)$$

Onde: (s) é o Desvio Padrão médio dos valores de intercepção do eixo y das curvas de calibração; e (S) é o coeficiente angular da equação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

4.3 Desenvolvimento das nanoemulsões

A formulação foi desenvolvida inicialmente através da construção de um diagrama de fases por meio do método de emulsificação espontânea, um método de baixa energia e de simples manejo, em que a mistura de tensoativos e a fase oleosa foram vertidas lentamente na fase aquosa sob agitação magnética constante (ANTON, 2009).

4.3.1 Construção do diagrama de fases

O diagrama foi conduzido através de titulação gota a gota da fase aquosa, constituída por água purificada ultrapura Milli-Q®, sob a mistura da fase oleosa vaselina com os tensoativos Tween 80: Plurol oleique (4:1).

A princípio a mistura dos tensoativos com a fase oleosa foi estabelecida nas proporções de (1:9), (2:8), (3:7), (4:6), (5:5), (6:4), (7:3), (8:2) e (9:1), respectivamente. Posteriormente essas misturas foram tituladas utilizando uma pipeta automática com a fase aquosa, sendo adicionado 1 mL, 10 vezes seguidas em cada mistura e posteriormente 10 mL, 9 vezes seguidas em cada mistura, sob agitação magnética

constante e com um intervalo de 5 min entre cada adição. As misturas foram classificadas de acordo com o aspecto visual entre cada adição de água e classificados em: separação de fases, turvo, límpido, formação de grumos, líquido, gel, emulsão e nanoemulsão.

Os dados das proporções obtidas referentes a áreas de transparência foram plotados utilizando o programa Origin Pro[®] 8.0 para obter o diagrama de fases (OriginLab Corporation, USA).

4.3.2 Seleção da formulação

A formulação selecionada foi a que apresentou maior área de sistemas transparentes com menor concentração de tensoativos e maior proporção de fase aquosa.

4.3.3 Incorporação de dipropionato de betametasona

Após selecionada a formulação, foi utilizado o método de alta energia por meio do ultrassom de ponta (KUMAR et al., 2019) para incorporar o fármaco na nanoemulsão. Em um béquer foi pesada a fase oleosa com os tensoativos e 0,5 mg/mL de dipropionato de betametasona, seguido pela adição lenta da fase aquosa. Posteriormente a mistura foi colocada sob ação de ultrassom de ponta (SONICS, Vibra Cel), operando com amplitude de 40%, pulsos de 30 em 10 segundos, por um período de 10 min e mantido sob banho de gelo.

4.4 Caracterização da nanoemulsão

Após desenvolvida, a nanoemulsão contendo o dipropionato de betametasona foi avaliada de acordo com o seu tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta, condutividade e pH.

4.4.1 Potencial zeta

Inicialmente foi preparada uma diluição aquosa da formulação na proporção de 1:50 (v/v). Em seguida, o potencial zeta da amostra foi analisado através do aparelho Zetasizer Nano ZS, por meio da determinação da mobilidade eletroforética das gotículas.

4.4.2 Tamanho de gotícula e PDI

Para a análise do tamanho hidrodinâmico das gotículas e do PDI foi preparada, inicialmente, uma diluição aquosa de 1:50 (v/v) a partir da formulação. Em seguida a amostra foi levada para ao aparelho Zetasizer Nano ZS, que através da inserção de um feixe de luz sobre a amostra é capaz de realizar o cálculo do seu espalhamento decorrido do movimento Browniano das gotículas (QUADROS, 2018).

4.4.3 Condutividade

Para a determinação da condutividade da formulação, o condutivímetro digital modelo CD-20 foi previamente calibrado com solução de KCl 0,1N à temperatura ambiente. A leitura foi realizada pela direta inserção do eletrodo sob a amostra.

4.4.4 Mensuração do pH

A leitura do pH da formulação foi determinada pela direta inserção, sob a amostra, do eletrodo do pHmetro digital da marca Digimed, modelo DM-22 que foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00 à temperatura ambiente.

4.5 Ensaio de permeação cutânea *in vitro*

Para a permeação cutânea *in vitro*, foram usados fragmentos de pele previamente retiradas de orelhas de porco, obtidos em um abatedouro local. Para a remoção da pele, as orelhas foram fixadas a uma placa lisa de isopor e retiradas cuidadosamente com o auxílio de um bisturi e uma tesoura. Posteriormente a pele foi lavada com água destilada e os fragmentos foram cortados para se encaixarem no tamanho da área difusional das células de Franz de 2 cm².

Os fragmentos de pele foram fixados nas células de difusão do tipo Franz de modo a separar o meio doador do meio receptor. Em seguida, este último foi preenchido com solução Tampão fosfato pH 7,4 e mantido sob agitação magnética durante todo o procedimento. Ao compartimento doador, 1 mL da nanoemulsão contendo dipropionato de betametasona 0,5 mg/mL foi colocado em contato com o estrato córneo da pele de suíno. Posteriormente as células montadas foram colocadas em banho maria com aquecimento a 32° ± 2°C, mantido até o final do teste, com período de 24 horas.

Como controle, os mesmos procedimentos foram realizados em pele de suíno com a utilização de 1 g de creme e de pomada contendo 0,5 mg/g de dipropionato de betametasona disponíveis no mercado.

As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação analisada

Ao final de cada teste de permeação (24 horas com a nanoemulsão, creme e pomada), as células de difusão foram desmontadas e as amostras de tampão do meio receptor foram para análise em CLAE. Os fragmentos de pele de suíno retirados foram limpos com água Milli-Q para retirar o excesso dos componentes presentes em ambos os compartimentos. Em seguida, os fragmentos de pele foram fixados a uma superfície lisa de isopor com o estrato córneo voltado para cima, que foi removido com o auxílio de 10 fitas adesivas (*tape stripping*).

Posteriormente, para extração do dipropionato de betametasona, as peles remanescentes e as fitas adesivas foram picotadas e colocadas em frasco âmbar junto com 5 mL de um solvente extrator (metanol). Em seguida os frascos foram colocados sob agitação por 24 h. Ao final deste período os sobrenadantes foram coletados, filtrados (a 0,44 μm) e levados para análise em CLAE.

4.6 Análise dos dados

Os dados foram expressos nas figuras e tabelas através das médias +/- desvio padrão dos ensaios realizados. O software prisma foi utilizado para fazer a análise estatística dos dados através de teste One-way ANOVA, em que a significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método

Lançando mão das boas práticas de laboratório, a validação do método analítico a ser empregado deve ser realizada para garantir a produção de resultados que condizem com a realidade e que sejam confiáveis, reprodutíveis e comparáveis (RIBANI M, 2004). Além disso, para assegurar que os procedimentos sejam conduzidos de forma a reduzir o número de erros que afetam a confiabilidade dos dados, é necessário que os aparelhos estejam calibrados e o analista tenha pleno conhecimento do seu manuseio (ANVISA, 2003).

Já está bem descrito que a utilização de CLAE, quando conduzido através de um método correto, apresenta bons resultados para detecção e quantificação de analitos. Desta forma a análise em CLAE, utilizada neste trabalho para a dosagem de dipropionato de betametasona tanto em amostras da formulação desenvolvida, quanto na pele, foi realizada usando uma coluna de fase reversa C₈ de dimensões 4,6 x 150 mm, 5 µm que uma fase móvel foi composta por Água Milli-Q e Acetonitrila, que foram misturadas de acordo com o seguinte gradiente:

0-8 min: Acetonitrila: Água Milli-Q 1% acetonitrila (47:53); vazão: 1,0 mL/min

8-12 min: Acetonitrila: Água Milli-Q 1% acetonitrila (55:45); vazão: 1,2 mL/min

12-18 min: Acetonitrila: Água Milli-Q 1% acetonitrila (47:53); vazão: 1,0 mL/min

O tempo de análise de cada amostra foi de 18 min em que o forno foi mantido em 40° C e a leitura realizada em 245 nm. A leitura do dipropionato de betametasona forneceu um pico no tempo de 10 min de eluição.

O método foi validado com relação a sua seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação.

5.1.1 Linearidade

A linearidade do método é analisada para avaliar sua capacidade de produzir resultados de medição que são diretamente proporcionais às concentrações do analito (YUWONO M, 2005). A Figura 14 abaixo apresenta a curva analítica com a

equação de regressão linear $y = a x \pm b$ obtida para análise de linearidade do método de quantificação do dipropionato de betametasona.

A equação de regressão linear obtida pela medição do dipropionato de betametasona foi $y = 47926x - 24744$ e o valor do coeficiente de correlação linear (r^2) foi de 0,998, valor que está dentro do limite estabelecido pela RE no 899 de 2003 da ANVISA, portanto, o método descrito aqui mostrou-se linear para a quantificação do dipropionato de betametasona em metanol numa ampla faixa de concentração que vai de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$.

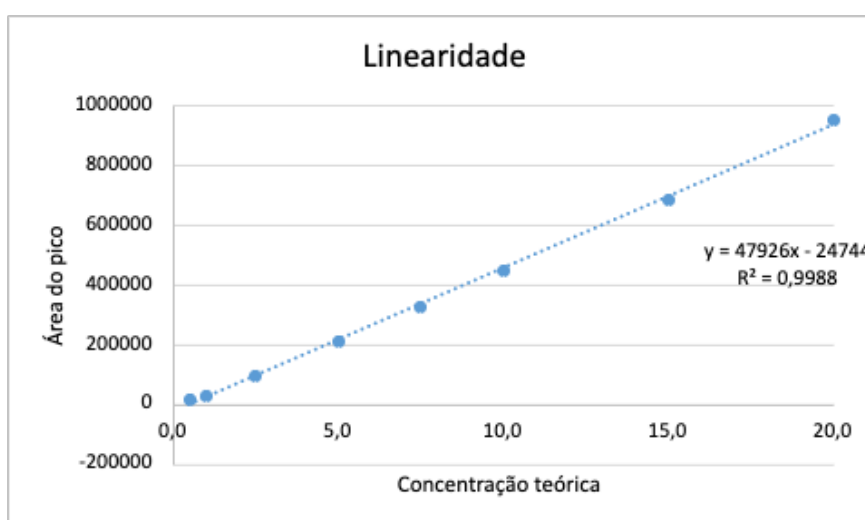


Figura 14. Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para as amostras contendo dipropionato de betametasona. Equação da reta: $y = 47926x - 24744$, $r^2 = 0,998$.

5.1.2 Seletividade

A seletividade refere-se à verificação da capacidade do método analítico de fornecer uma leitura do analito de interesse sem a interferência de outras substâncias presentes na formulação ou de outros interferentes provenientes dos ensaios de análise, garantindo, assim, que se obtenha o pico exclusivo do analito. Esta análise pode ser obtida pela direta inserção ao CLAE dos componentes de interesse a serem analisados e posteriormente avaliar, de forma comparativa, os picos gerados (RIBANI M, 2004).

Para avaliar a seletividade do método em analisar o dipropionato de betametasona na presença dos possíveis interferentes decorrentes dos processos a serem realizados neste trabalho, foi injetado ao CLAE em sextuplicata as cinco amostras seguintes: 1ª: Dipropionato de Betametasona, 2ª: Nanoemulsão +

Dipropionato de Betametasona, 3ª: Dipropionato de Betametasona + Estrato córneo, 4ª: Dipropionato de Betametasona + Pele remanescente e 5ª: Tampão fosfato pH 7,4. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na imagem abaixo (Figura 15):

Comparando-se os picos gerados pelo equipamento foi possível inferir que a presença dos possíveis interferentes presentes do processo não gera nenhuma diferença na magnitude do pico do dipropionato de betametasona, uma vez que no tempo de eluição do fármaco nenhum dos interferentes são eluídos. Portanto o método mostrou-se seletivo para as análises que serão mostradas a seguir.

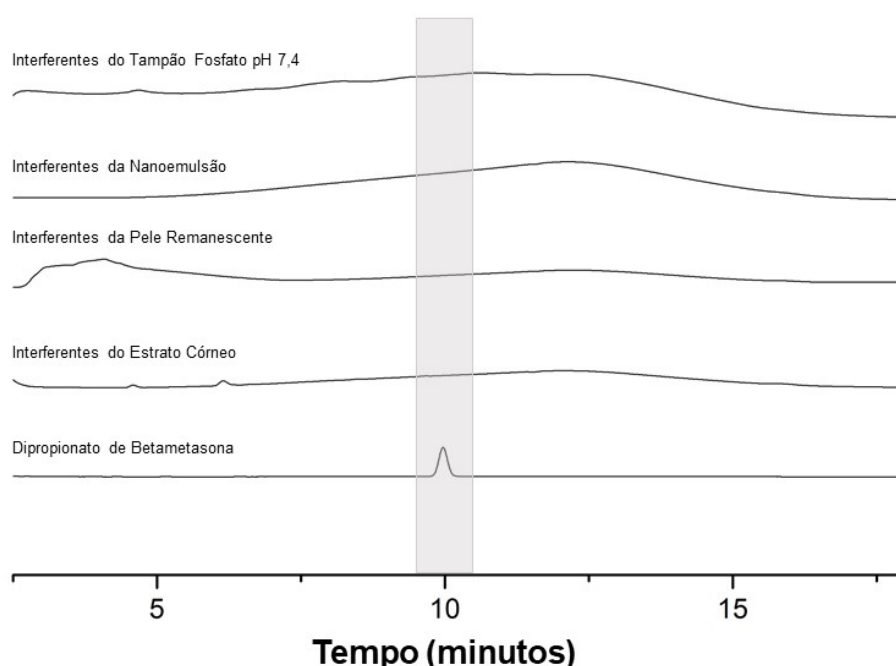


Figura 15. Cromatogramas referentes à injeção da formulação e de interferentes presentes no processo de extração cutânea do dipropionato de betametasona para demonstrar a seletividade do método analítico.

5.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção refere-se à capacidade do método de detectar a presença de um analito de interesse com um nível de significância estatística aceitável. Desta forma, pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser determinado por meio de um procedimento analítico que, na prática, é determinado como três vezes maior que o nível de ruído do equipamento (P. KONIECZKA, 2012; J. SILBERRING, 2016). Já o limite de quantificação pode ser definido como a menor

concentração do analito que pode ser quantificado pelo método com exatidão e precisão (ANVISA, 2003).

Os valores do limite de detecção e quantificação calculados para o dipropionato de betametasona a partir das curvas analíticas estão expostos na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Valores teóricos calculados para o limite de detecção e limite de quantificação do método de quantificação de Dipropionato de Betametasona em metanol.

Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
0,189	0,574

Verifica-se que se trata de concentrações muito diminutas, capazes de dosar pequenas quantidades dos fármacos nas amostras de interesse. O limite de quantificação, mais especificamente, é igual ao menor ponto da curva analítica, conforme é recomendado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

5.2 Obtenção das nanoemulsões

A formulação nanoemulsionada foi preparada por emulsificação espontânea para posterior incorporação do fármaco dipropionato de betametasona pelo método de alta energia de ultrassom de ponta (SONICS, Vibra Cel).

Os componentes da nanoemulsão foram selecionados para que sejam atóxicos para uso tópico, além de serem quimicamente compatíveis uns com os outros (He C-X, 2010). Assim, os tensoativos escolhidos foram o Tween® 80 e o Plurol® oleique, enquanto as fases oleosa e aquosa foram constituídas pela vaselina líquida e água milli-Q, respectivamente.

O Tween® 80 (Polissorbato 80), produzido a partir de sorbitol natural e ácido oleico vegetal, é um tensoativo não iônico formado por grupos de moléculas de caráter hidrofílico e lipofílico que permitem a obtenção de nanoemulsões estáveis. Seu baixo potencial de irritação da pele e atoxicidade são vantagens interessantes que o torna desejável para aplicação em uma ampla gama de preparações farmacêuticas, cosméticas e de cuidados para a pele (MAPRIC; THACKABERRY E, 2010).

O Plurol® oleique (Propilenoglicol monocaprilato), produzido a partir de ésteres de propilenoglicol de ácido caprílico, é um surfactante não-iônico, de perfil atóxico e fortemente lipofílico usado pela indústria farmacêutica e de cosméticos em preparações tópicas como co-tensoativo para formulações nanoemulsionadas e para

solubilização de fármacos de forte caráter hidrofóbico (GATTEFOSSÉ; EFFENDY I, 1995).

A vaselina líquida, formada por hidrocarbonetos alifáticos obtidos do petróleo, é um líquido oleoso incolor que, devido a sua propriedade emoliente e perfil de baixa toxicidade a pele, é usado como fase oleosa de emulsões tópicas em geral e outras inúmeras preparações farmacêuticas para a pele e cabelos (MAPRIC; ROWE RC, 2009).

O desenvolvimento da nanoemulsão foi conduzido através da construção de um diagrama de fases pseudoternário pelo método de titulação gota a gota em que foi possível identificar as regiões de formação de nanoemulsão bem como a proporção dos seus componentes (SILVA A, 2009). Embora a adição de tensoativo e co-tensoativo seja necessária para a formação de uma nanoemulsão, pois sem uma quantia mínima de tensoativo a tensão interfacial não seria quebrada, a formulação escolhida foi a que possuía menor concentração possível de tensoativos, para produzir uma nanoemulsão de forma eficaz e que seja menos irritativa à pele (AZEEM A, 2009).

O diagrama de fases pseudoternário obtido pela análise de 9 amostras com diferentes proporções de fase aquosa, fase oleosa e tensoativos está apresentado na Figura 16 abaixo.

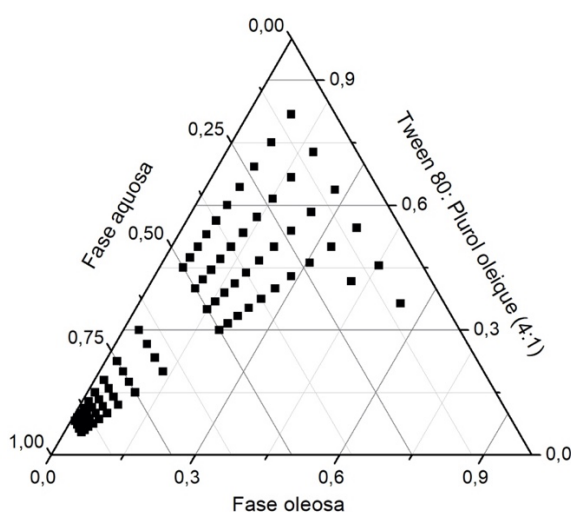


Figura 16. Diagrama de fases pseudoternário construído após a titulação ponto a ponto de diferentes concentrações dos componentes para desenvolvimento da nanoemulsão.

Durante a o processo de titulação ponto a ponto para a construção do diagrama de fases pseudoternário os resultados da observação visual foram de formação de nanoemulsão nas amostras em que a proporção de tensoativos era maior do que a de fase oleosa, sendo caracterizadas como gel nos primeiros pontos de adição de fase aquosa, e líquidos em pontos em que a proporção de fase aquosa se torna superior à dos outros componentes.

Já nas amostras em que a proporção de fase oleosa era maior que a de tensoativos, houve formação de líquidos turvos com a adição da fase aquosa, sendo observada a separação de fases em amostras que a proporção de tensoativos era muito baixa.

Após a análise do diagrama de fases pseudoternário, a formulação que teve as características mais adequadas para aplicação tópica foi selecionada para a incorporação do dipropionato de betametasona e está descrita na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Composição da formulação desenvolvida e selecionada para incorporação de dipropionato de betametasona.

Formulação	Fase aquosa (%)	Fase oleosa (%)	Tensoativos (%)
NE O/A	85,71	4,29	10,0

A formulação final, contendo 0,5 mg/mL de dipropionato de betametasona já incorporado, apresentou-se como uma formulação líquida, transparente/translúcida e heterogênea, como mostrado na Figura 17.

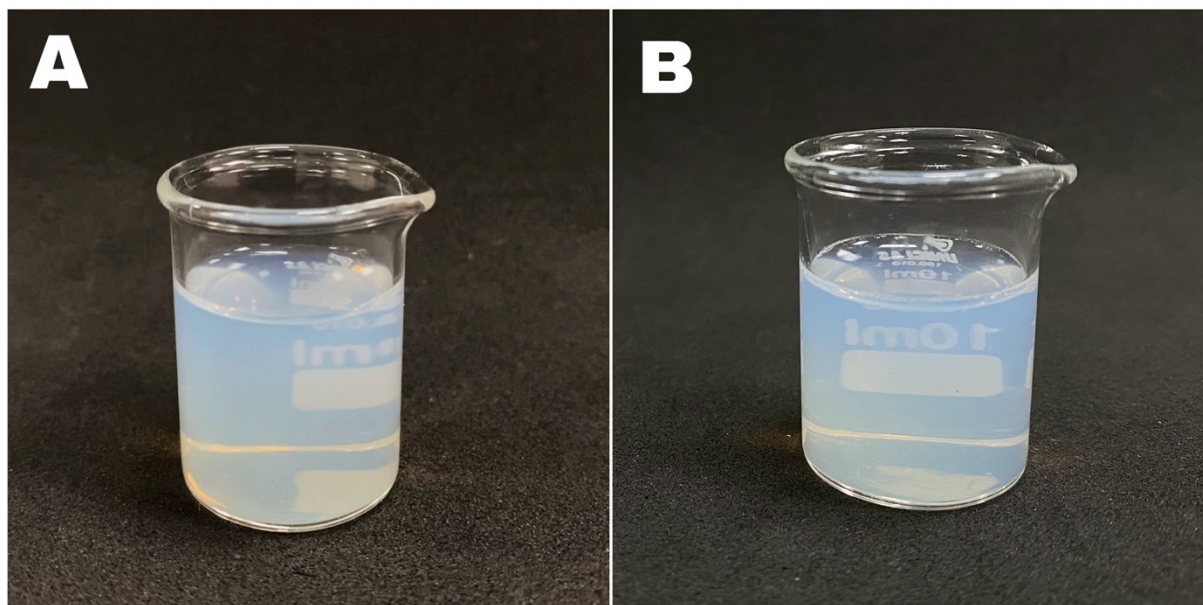


Figura 17. Aspecto da formulação selecionada (A) antes e (B) após a incorporação do Dipropionato de Betametasona.

5.3 Caracterização das nanoemulsões

A formulação contendo o dipropionato de betametasona foi caracterizada quanto ao seu tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta, condutividade e pH. Os valores adquiridos estão expressos na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Caracterização da formulação contendo o Dipropionato de Betametasona quanto ao tamanho da gotícula (nm), PDI, potencial zeta (-mV), pH e condutividade (uS/cm).

Tamanho da gotícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH	Condutividade (uS/cm)
23,55 ± 0,44	0,200 ± 0,004	-4,24 ± 1,69	6,0	47,1

De fato, os componentes da formulação e o método de preparação escolhido têm importante influência sobre o tamanho das gotículas formadas na nanoemulsão (BRUXEL F, 2012). A análise do tamanho das gotículas da formulação apresentou um bom resultado, uma vez que as gotículas, com um tamanho médio de 23,55 nm estão em uma faixa de tamanho bem reduzido o que é satisfatório para um sistema de nanoemulsão por garantir a grande estabilização do sistema ao longo do tempo, que potencialmente resultará em um produto com alto tempo de prateleira.

Já o PDI fornece informações a respeito da homogeneidade da distribuição dos

tamanhos de gotícula do sistema. Em uma escala de 0-1, valores próximos ao 0 indicam que o sistema é monodisperso (MOGHIMIPOUR E, 2013). A formulação contendo o dipropionato de betametasona obteve valor de PDI muito próximo ao ideal (0,200), caracterizando-a como nanoemulsão homogênea e monodispersa, também indicativo de alta estabilidade do sistema.

O potencial zeta reflete o potencial elétrico no plano de cisalhamento da formulação e é um indicador de carga superficial útil para prever instabilidades na nanoemulsão através das forças de repulsão que evitam processos de floculação e coalescência após longo tempo de armazenamento. Valores altos de potencial zeta ($>|30|$ mV) sugerem partículas altamente carregadas, que geram repulsão e consequentemente uma boa estabilização. O valor de potencial zeta obtido pela análise da formulação deste estudo, de -4,24 mV, foi um valor considerado próximo ao nulo e, portanto, pode-se inferir que não há estabilização por repulsão eletrostática, embora deva-se levar em conta que os valores de potencial zeta não são uma medida absoluta da estabilidade da nanoemulsão (HEURTAULT B, 2003; SHYAM S, 2019).

O pH mensurado da nanoemulsão ficou em uma faixa levemente ácida (6,0), um valor adequado para formulações tópicas por garantir sua compatibilidade com o pH da pele (que apresenta pH localizado entre 4,6 – 5,8) em razão de irritabilidade, sustentar processos fisiológicos e contribuir para a proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Além disso este valor ácido de pH garante compatibilidade da formulação com o dipropionato de betametasona que fica mais estável em meio ligeiramente ácido (pH 4 - 6) (BORDAS O.X, 2003; YILMAZ, M.D, 2016).

A mensuração da condutividade elétrica avalia a passagem da corrente elétrica pela formulação. A condutividade da formulação, no valor de 47,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, foi um valor considerado alto, mas já esperado, uma vez que nanoemulsões do tipo O/A tem uma alta taxa de condução de corrente elétrica, por possuírem água na fase externa (BHOSALE, M.A, 2014).

5.4 Ensaio de permeação *in vitro*

Para análise da permeação cutânea *in vitro* do dipropionato de betametasona foram utilizados fragmentos de pele de orelhas de suínos que foram adaptadas em células de Franz. A formulação nanoemulsionada desenvolvida foi aplicada sobre a pele bem como os seus respectivos controles (pomada e creme disponíveis no mercado) e o ensaio foi conduzida por 24 h.

Já está bem descrito na literatura que o dipropionato de betametasona, assim como os corticosteroides de uma maneira geral, têm uma baixa permeabilidade através de membranas biológicas, o que representa sua principal desvantagem na prática clínica (HANNA PA, 2019; BANGALE et al., 2012). Nesse sentido, é de se esperar que haja uma certa dificuldade para este fármaco penetrar para as camadas mais profundas da pele, o que pôde ser demonstrado pela análise do tampão presente no compartimento receptor das células de Franz, em que não foi detectado o dipropionato de betametasona em nenhum dos três sistemas analisados.

A Figura 18 abaixo apresenta a quantidade de dipropionato de betametasona recuperada do estrato córneo e da pele remanescente após tratamento por 24 h com a nanoemulsão desenvolvida e com os controles.

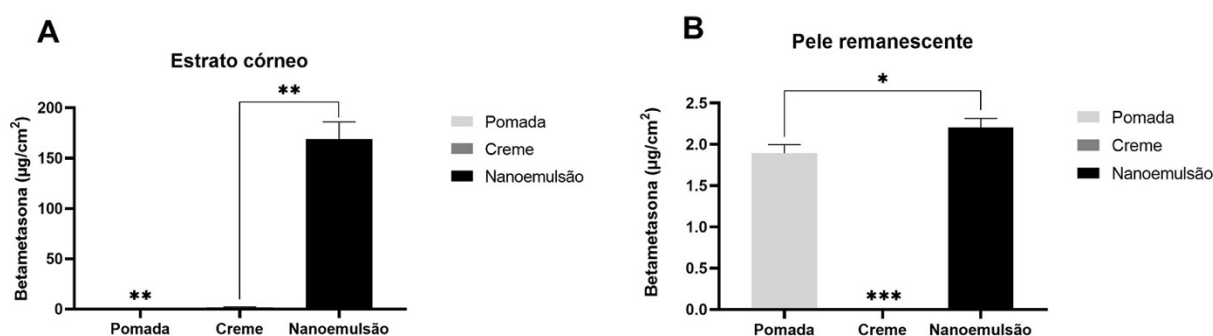


Figura 18. dipropionato de betametasona recuperado do (A) estrato córneo e da (B) pele remanescente após um período de 24 h de tratamento com a nanoemulsão e os controles (creme e pomada). Os (*) indicam que há diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$. Os (**) indicam que há diferença significativa com $p < 0,01$. Os (***) indicam que há diferença significativa com $p < 0,001$. As barras representam o desvio padrão de 3 determinações.

É possível verificar, após a análise dos dados de permeação no estrato córneo, que em um período de 24 h não houve penetração do fármaco a partir da formulação controle de pomada. Já a penetração do dipropionato de betametasona a partir do creme foi de $2,15 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ao passo que a penetração a partir da nanoemulsão foi de $169,09 \pm 13,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o que demonstra que a formulação nanoemulsionada desenvolvida aumentou cerca de 80 vezes, e de maneira significativa ($p < 0,05$), a penetração do fármaco no estrato córneo, quando comparada ao controle de creme.

Já na análise da permeação na pele remanescente, que representam as camadas mais internas da pele, que é o alvo terapêutico para a psoríase, num período

de 24 h de tratamento, é possível constatar que a penetração do dipropionato de betametasona a partir da pomada foi de $1,89 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ao passo que não foi detectado o fármaco na permeação controle com o creme. Já a penetração do dipropionato de betametasona a partir da nanoemulsão foi de $2,20 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o que caracteriza um aumento de cerca de 16%, de forma significativa ($p < 0,05$), da permeação do fármaco na pele remanescente a partir da nanoemulsão, quando comparada ao controle de pomada.

Desta forma, a análise da permeação demonstra que a nanoemulsão desenvolvida foi capaz de exercer um efeito potencializador importante na absorção do dipropionato de betametasona no interior da pele, mas sobretudo pelo estrato córneo. Apesar desta camada mais superficial não ter interesse terapêutico, o acúmulo do fármaco nesta camada pode significar um depósito para que haja manutenção de quantidades de fármaco disponível para atingir as camadas mais profundas da pele, mesmo após a retirada da formulação da superfície da pele.

É importante observar que no complexo processo de permeação cutânea, as características físico-químicas do fármaco devem ser levadas em conta durante a sua interação com as estruturas da pele, mas também deve-se levar em conta o papel promotor da formulação sobre esta interação (ARNE N, 2013). No caso das nanoemulsões, esta função de promover o melhoramento da permeação transdérmica já está bem descrita – quando comparada com formulações tópicas convencionais (SINGH, 2013; KIRCIK L, 2017). Isso é explicado pelo fato de os tensoativos, presentes na nanoemulsão, serem capazes de interagir com o estrato córneo, interrompendo sua propriedade de barreira e induzindo vias aumentadas de permeação do dipropionato de betametasona. Além disso, as gotículas reduzidas ao tamanho manométrico, que aumentam a superfície de contato do fármaco com a pele, e ainda o aumento da atividade termodinâmica do medicamento promovem uma melhor interação entre o fármaco e as estruturas do estrato córneo (SHAKER, 2019; HARWANSK RK et al, 2007).

Outros estudos com o dipropionato de betametasona demonstraram resultados semelhantes no que se refere ao aprimoramento da sua permeação. HANNA PA (2019), por exemplo, demonstrou que o dipropionato de betametasona penetra de forma mais eficiente na pele de rato *ex vivo* quando formulado em um sistema de carreador lipídico nanoestruturado do que quando comparado a um creme disponível

no mercado. Nós acreditamos, no entanto, que o sistema nanoemulsionado é um sistema mais interessante para este tipo de tratamento, por seu preparo ser mais fácil e barato, o que encarece menos o produto final.

6 CONCLUSÃO

A nanoemulsão contendo dipropionato de betametasona desenvolvida neste estudo apresentou um baixo tamanho de gotícula, um valor PDI que caracteriza a formulação como monodispersa, um pH compatível com a pele e com os componentes da formulação, porém o valor de potencial zeta próximo ao nulo configura ausência de estabilidade eletrostática, que juntos indicam uma boa estabilização do sistema formado. O método analítico empregado no CLAE para a quantificação do dipropionato de betametasona, incorporado a formulação desenvolvida, pode ser considerado seletivo e linear de acordo com as diretrizes da ANVISA, e, portanto, é capaz de realizar as análises deste estudo de forma adequada.

O teste de permeação *in vitro* em pele de orelha de suíno demonstrou que a nanoemulsão desenvolvida neste estudo foi um eficiente promotor da penetração do dipropionato de betametasona no estrato córneo e na pele remanescente em comparação a um creme e pomada comerciais. Assim, o sistema de liberação desenvolvido deve representar uma opção terapêutica promissora para o tratamento de psoríase.

7 REFERÊNCIAS

AGATEMOR, C., et al. Ionic liquids for addressing unmet needs in healthcare. **Bioeng. Transl. Med.** v.3; n.(1), p. 7–25 (2018)

AKIYAMA M, et. al. Auto inflammatory keratinization diseases: An emerging concept encompassing various inflammatory keratinization disorders of the skin. **J. Dermatol. Sci.** v. 90 n. 2: p.105-111.2018 May

AL-SHOBAILI, H. A, QURESHI. M. G. Pathophysiology of Psoriasis: Current Concepts. **Intech Open.** 2013 DOI: 10.5772/54113

AMMAR-KHODJA A, et al. EPIMAG: International Cross Sectional Epidemiological Psoriasis Study in the Maghreb. **Dermatology.** v.231 n.(2): p.134-44 2015

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003, p. 1–15, 2003.

ARAUJO, A. R. D. et al. Radiofrequency for the treatment of skin laxity: mith or truth. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 90, n. 5, p. 707-721, 2015.

AUGUSTIN, M, et al. Epidemiology and Comorbidity in Children with Psoriasis and Atopic Eczema. **Dermatology.** v. 231 n. (1): p.35-40. 2015

BACHELEZ H. Pustular psoriasis and related pustular skin diseases. **Br. J. Dermatol.** ;v 178 n (3): p 614-618. Mar 2018

BAI, L, HUAN, S, LI, Z, MCCLEMENTS, D.J .Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. **Food Hydrocolloids** n.66: p. 144–153. 2017

BANGALE MS, MITKARE SS, GATTANI SG, SAKARKAR DM. Recent nanotechnological aspects in cosmetics and dermatological preparations. **Int. J Pharm. Pharmac. Sci.** v.4, n.2, 2012

BAROT, B.S.; et al. Microemulsion-based gel of terbinafine for the treatment of onychomycosis: Optimization of formulation using D-optimal design. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** n.13, p.184–192. 2012

BHOSALE, R.R, et al.. Nanoemulsion: A Review on novel profusion in advanced drug delivery. **Indian J Pharm Biol Res.** n.2: p.122-7. 2014

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

BOLZINGER, M-A, et al. . Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Curr Opinion Colloid Interface Sci** n. 17: p. 156-65. 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA Nº 1854/2018-C

BRUNO, A. (2010). Caracterização, análise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametasona – USP. **Ann. Rheum. Dis**, n. 64, p. 83-86. 2015

CALLENDER, S. P., et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. (1-2), p. 425–442. 2017

CASIRAGHI, A., et al. Topical Treatment of Infantile Haemangiomas: A Comparative Study on the Selection of a Semi-Solid Vehicle. **Skin Pharmacology and Physiology**. v.29, n. (4): p.210–219. 2016.

CHEN, Y., et al. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Asian J. Pharm. Sci.** v. 9, n.2, p.51–64 2014.

CINTRA, G.A, et al. Bioadhesive Surfactant Systems for Methotrexate **Skin Delivery. Molecules.** v.21, n.(2) p.:231. 2016 Published 2016 Feb 18.

DAI, L, et al. Formation and characterization of zein-propylene glycol alginate-surfactant ternary complexes: Effect of surfactant type. **Food Chem**, n. 258; p. 321–330. 2018.

DONADUSSI, M. Revisão sistemática da literatura sobre a efetividade clínica do plasma rico em plaquetas para o tratamento dermatológico estético. **Dissertação** (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde)– Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, f99, 2012. Disponível: <http://hdl.handle.net/10923/4557>. Acesso 2020

EFFENDY I, MAIBACH HI. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. **Contac Dermat.** 33:217–25. 1995

ESTEVEES, I. Psoríase: Recentes Avanços na Compreensão sa Doença e sua Terapêutica. **Mestrado**, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia 2013

FOTIADOU C, LAZARIDOU E, IOANNIDES D. Management of Psoriasis in adolescence. **Adolescence Health Med Ther.** n.5:p.25–34. 2014

GABROS, S, ZITO, P.M. Topical Corticosteroids. [Updated 2019 Dec 9]. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing;

GAJULA, K., et al.. In-Silico Skin Model: A Multiscale Simulation Study of Drug Transport. **J. Chem. Inf. Model.** v.57, n.(8),p. 2027–2034 2017.

GIANFALDONI S, et. al. Secondary Syphilis Presenting As Palmoplantar Psoriasis. **Open Access Maced J Med Sci** .v, 5 n. (4): p. 445-447. 25 Jul. 2017

GIANFALDONI S, et. al. Pustular Palmoplantar Psoriasis Successfully Treated with Nb-UVB Monochromatic Excimer Light: A Case-Report. **Open Access Maced J Med Sci.** v..5 n.(4): p.462-466 25 Jul 2017.

GATTEFOSSÉ. [Internet]. Plurol oleique CC497. <https://www.gattefosse.com/plurol-oleiquecc-497>

GISONDI P, et. al. Management of moderate to severe psoriasis in patients with metabolic comorbidities. **Frontiers in Medicine.** |Volume 2 | Article 1 | 1 January 2015

GISONDI P, GIROLOMONI G. Impact of TNF- α antagonists on the quality of life in selected skin diseases. **G Ital Dermatol Venereol** n.148: p. 243–8. 2013

GONZALEZ-MIRA, E., et al. . Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. Colloids Surf. **B Biointerfaces.** v..81, n. (2), p. 412–421. 2010

GUO, X, et al. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan. **J Agric Food Chem.** n.62: p. 1088–1095. 2014

GUPTA, R., KASHYAP, N.,RAI, B. Transdermal cellular membrane penetration of proteins with gold nanoparticles: a molecular dynamics study. Phys. Chem. **Chem. Phys.** v.19, n. (11), p. 7537–45 (2017)

GUPTA, R., RAI, B. In-silico design of nanoparticles for transdermal drug delivery application. **Nanoscale**. v. 10; n.(10), p. 4940–4951 (2018).

GUPTA, R., SRIDHAR, D., RAI, B. Molecular Dynamics Simulation Study of Permeation of Molecules through Skin Lipid Bilayer. **J. Phys. Chem. B**. n. 120, p. 8987–8996 (2016).

GUPTA, R., SRIDHAR, D., RAI, B. Molecular dynamics simulation study of translocation of fullerene C 60 through skin bilayer: effect of concentration on barrier properties. **Nanoscale** v.9, n. (12), p. 4114–27 (2017).

HANNA, P.A, GHORAB, M.M, GAD, S. Desenvolvimento de transportadores lipídicos nanoestruturados carregados com dipropionato de betametasona para administração tópica e transdérmica. **Agentes anti-inflamatórios e antialérgicos em química medicinal**, v.18, n. (1), p. 26–44. 2019

HARRIS, M. I. N. C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo: **SENAC**, p 352, 2009.

HYGOR MEZADRI. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos - UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. 2010

JAISWAL, M, DUDHE, R, SHARMA, P.K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**. v.;5; n.(2): p. 123–127. 2015

JARMEEL, B.M.; et al. Computer-based formulation design and optimization using Hansen solubility parameters to enhance the delivery of ibuprofen through the skin. **Int. J. Pharm.** n. 569, p 118549. 2019

JUTTULAPA, M, et al. Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences** n.12; p. 21–27. 2017

KAUR, A, et al. Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells. **Stem Cells Int**. 2019:1286054. Published 2019 Jul 1.

KIM, Y. S. et al. - Erythrodermic psoriasis improved by ustecinumab: A report of two cases. **Annals of Dermatology**, n. 28 p.121–122 2016

KOLARSICK, P. A. J; KOLARSICK, M.A, A, GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin; **Journal of the Dermatology Nurses' Association**: Volume 3 - Issue 4 - p 203-213. 2011 July-August

KOSUMI, H. et. al. Generalized Pustular Psoriasis, **The Journal of Pediatrics**, p.188:305 2017

KUMAR, M, et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: **A Review. Prev Nutr Food Sci.** v.24; n.3; p.:225–234. 2019

LEBWOHL, M., TING, P. T., KOO, J. Y. M. , Psoriasis treatment: traditional therapy, case report, **Saudi J Biol Sci**, n. 22, p. 117-121. 2015

LI, J, et al. Ultrasonic degradation kinetics and rheological profiles of a food polysaccharide (konjac glucomannan) in water. **Food Hydrocolloids**; n. 70: p.14–19. 2017

LIU, S. et al. Peptide delivery with poly (ethylene glycol) diacrylate microneedles through swelling effect. **Bioengg. Trans. Med.** v. 2; n.(3),p. 258–267; 2017.

LOWES, M. A., BOWCOCK, A. M., & KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v.445; n.7130; p. 866-873. 2007

MAHAJAN, R; HANDA S. Pathophysiology of psoriasis. Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology. **Volume : 79 Issue : 7 Page : 1-9** 2013

MAHMOOD T, ZAGHI D, MENTER A. Emerging oral drugs for psoriasis. **Expert Opin Emerg Drugs.** v 20 n(2): p209–220 2015.

MALIK, I. A., AKHTER, S, KAMAL, M. A. Treatment of psoriasis by using Hijamah: A case report. **Saudi J Biol Sci.** v.22. n.(1):p. 117-21. 2015 doi: 10.1016/j.sjbs.2014.09.004. Epub 2014 Sep 10.

MAPRIC. [Internet]. Tween 80 – boletim técnico
https://mapric.com.br/pdf/boletim544_21052008_113145.pdf

MAPRIC. [Internet]. Vaselina Líquida – boletim técnico
https://mapric.com.br/pdf/Boletim988_21122015-16h33.pdf

MARQUEING AL, CORDORO KM. Systemic treatments for severe pediatric psoriasis: a practical approach. **Dermatol Clin.** v.31 n.(2):p. 267–288. 2013

MARQUES PINTO, G.; FILIPE, P. - Normas de Boa Prática para o tratamento da Psoríase em Placas em Idade Não Pediátrica com Biológicos. **Acta Medica Portuguesa**, n.25, p.125–141. 2012

MATTOZZI, C et al. Psoriasis: new insight about pathogenesis, role of barrier organ integrity, NLR/CATERPILLER family genes and microbial flora. **J Dermatol**. 2012 Sep; v.39, n.9: p. 752-60. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01606.x. Epub 2012 Jun 14.

MENTER, A, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. **J Am Acad Dermatol**. v.58; n. (5): p. 826–50. 2008

MICELI, A. SCHMEIDER G.J. **Palmo plantar Psoriasis**. Stat Pearls 2017. Acessado Maio 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448142/>

MOONEY, E et al. , Adverse effects of topical corticosteroids in paediatric eczema: Australasian consensus statement. **Australas J Dermatol**. v.56; n.(4); p. :241-51. 2015 doi: 10.1111/ajd.12313. Epub 2015 Mar 6.

MUMOLI N, et al. Erythrodermic psoriasis. **QJM**. v.107 n.(4): p 315. 2014

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGYINFORMATION. PubChem Database. CID=45356876, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betamethasone-17_21-dipropionate (accessed on Feb. 13, 2020)

NESTLE, F.O, KAPLAN, D.H, BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**. v.361, n.(5), p. :496–509. 2009

OSTERTAG, F, WEISS, J, MCCLEMENTS, D.J Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **J Colloid Interface Sci**. v.388; n.(1): p. 95–102. 2012

PARISER D. et al. Psoriasis Patient Interview Study Group. A multicenter, non-interventional study to evaluate patient-reported experiences of living with psoriasis. **J Dermatol Treat**. p. 1-8. 2015

PROW, T.W. et al. Nanoparticles and micro particles for skin drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev** n. 63: p. 470-91 2011

PSORÍASE BRASIL Psoríase, comorbidades, diagnóstico. Relatório Global da Psoríase. 2017

QUADROS, H. C. Desenvolvimento de nanopartículas para a liberação de adrenomedulina-2 no miocárdio infartado. 2018. 96 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RACZ, E; PRENS E.P. Phototherapy and photo chemotherapy for psoriasis. **Dermatol Clin.** v. 33 n.(1): p. 79–89. 2015

RAI, V. K., et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, n.270,p. 203–225. 2018

RAYCHAUDHURI, S.K.; MAVERAKIS, E; RAYCHAUDHURI, S.P. Diagnosis and Classification of Psoriasis. **Autoimmune Rev.** v.13; n.4-5; p.490-5. Apr-May 2014 doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.008. Epub 2014 Jan 13.

RIBEIRO, T. (USP) - Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete. 2015

RIBANI M, BOTTOLI CBG, COLLINS CH. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**; 27(5):771–80. 2004

RODRIGUES, A. P.; TEIXEIRA, R. M. - Desvendando a psoríase. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, n. 41, p 303–309. 2009

ROWE RC, SHESKEY PJ, QUINN ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th ed. Washington: **Pharmaceutical Press**; 2009. 917

SABERI, A.H, FANG, Y, MCCLEMENTS, D.J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **J Colloid Interface Sci.** n.391:, p. 95–102. 2013

SALVIA-TRUJILLO, L, et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of micro fluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocoll.** v.30, n.(1):, p. 401–407. 2013

SARAC, G, KOCA, T. T, BAGLAN, T. A brief summary of clinical types of psoriasis. **Northern Clinics of Istanbul.** v..3. n.1; p. 79-82. 2016. doi:10.14744/nci.2016.16023.

Shyam S; Shivendu R; Nandita D. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery. 978-0-12-814031-4. 2019 <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00272-0>

SIMON, A., et al. Development and validation of a discriminative dissolution test for betamethasone sodium phosphate and betamethasone dipropionate intramuscular injectable suspension. **AAPS PharmSciTech.** v.14, n. 1; p. 425–434. 2013

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. SBD. 2016

STINCO G, ERRICHETTI E. Erythrodermic psoriasis: current and future role of biologicals. **Bio Drugs.** v.29 n.(2): p. 91–101. 2015

SUNDARRAJAN, S, ARUMUGAM, M. Comorbidities of Psoriasis - Exploring the Links by Network Approach. **PLoS One.** v.11. n.(3): p. e0149175. 2016 Published 2016 Mar 11. doi:10.1371/journal.pone.0149175

SWINDELL WR, et al. RNA-Seq Analysis of IL-1B and IL-36 Responses in Epidermal Keratinocytes Identifies a Shared MyD88-Dependent Gene Signature. **Front Immunol.** n.9: p. 80 2018

TABASSUM, N, HAMDANI M. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacogn Rev.** v.8; n. (15): p. 52-60. 2014 doi: 10.4103/0973-7847.125531. PMID: 24600196; PMCID: PMC3931201.

TADWEE, I. K., GORE, S., GIRADKAR, P. Advances in Topical Drug Delivery System: A Review, **Int. J. Pharma. Re.s Allied. Sci,** n.1, p. 14-23. 2012

TAMEGA, A.A. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** n. 27, p. 151-6 2013

THACKABERRY EA, KOPYTEK S, SHERRATT P. Comprehensive investigation of hydroxypropyl methylcellulose, propylene glycol, polysorbate 80, and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for use in general toxicology studies. **Toxicol Sci.** 2010;117(2):485-492. doi:10.1093

VAIDYA T.S, LEWALLEN, R.S, FELDMAN, S. R. Erythrodermic psoriasis and severe hypotension requiring intensive care unit hospitalization: poor treatment outcome as a result of poor adherence. **J Dermatology Treat.** v.27 n.(2): p.134–135 2015

VIDE, J; MAGINA, S. Moderate to severe psoriasis treatment challenges through the era of biological drugs. **An. Bras. Dermatol.** vol.92 n.5 RJ Sept./Oct. 2017

VINOD, S, et al. Microemulsions as Promising Delivery Systems: A Review - Published on:11th Feb, 2015 **Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education**; v.45; n. (4): p. 392-401. 2011

WAIS, M, et al. Nanoemulsion-Based Transdermal Drug Delivery System for the Treatment of Tuberculosis. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov.** v.12; n.(2): p.107–119. 2017

WANG Q, LIU W, ZHANG L. Clinical features of von Zumbusch type of generalized pustular psoriasis in children: a retrospective study of 26 patients in southwestern China. **An Bras Dermatol.** v..92 n.(3):p 319-322 May-Jun 2017

WARREN, R.B.; CHALMERS, R.J.G.; GRIFFITHS, C.E.M., MENTER, A. Methotrexate for Psoriasis in the Era of Biological Therapy. *Clin Exp Dermatol.* Aug;33(5):551-4. 2008

WILSMANN-THEIS D, et al. Palmoplantar pustulosis - a cross-sectional analysis in Germany. **Dermatol. Online J.** v.23 n.(4) Apr 15 2017

YAMAUCHI, P. DFD-01: a novel topical formulation of betamethasone dipropionate for the treatment of extensive psoriasis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v.13, n.(2),p. 85–91 2016.

YUWONO, M., & INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology Volume 32**, 243–259. 2005

ZANETA, T.S.M., et al. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. **Int J Nano medicine.** n.13: p.2827–2837. 2018

ZHANG, L. W. et al. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil Nanoemulsions, **Int. J. Nanomed**, n. 6, p. 693-704. 2011

ZHANG, P, WU, M.X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers Med Sci.** v.33, n. (1):. p. 173-180. 2018

NASTITI, M R R et al. “Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery.” **Pharmaceutics** vol. 9,4 37. 21 Sep. 2017,

ARMSTRONG AW; READ C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. **JAMA.** 323(19):1945–1960. 2020

SHAKER D.S.; ISHAK, R.A.H.; GHONEIM, A. Nanoemulsion: A Review on Mechanisms for the Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs. **Sci. Pharm.** 87, 17. 2019

SINGH, R.; CHAKRAVORTY, A.; KUMAR, P. NANOEMULSION: An Effective Therapy for Transdermal Drug Delivery. **Res. J. Biol**, 3, 33–38. 2013

KUMAR M, BISHNOI RS, SHUKLA AK. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. **Prev Nutr Food Sci**; 24(3):225-234. 2019

ANTON N, VANDAMME TF. The universality of low-energy nano-emulsification. **Int J Pharm**;377(1-2):142-147. 2009

SILVA J.A, DAMASCENO B.P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Rev. Bras. Farm.**, 90(3): 245-249, 2009

AZEEM A, RIZWAN M, AHMAD FJ, et al. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. **AAPS PharmSciTech**. 10(1):69-76. 2009;

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

MOGHIMIPOUR E, SALIMI A, EFTEKHARI S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. **Adv Pharm Bull**. 3(1):63-71. 2013

HEURTAULT B, SAULNIER P, PECH B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**;24(23):4283-4300. 2003

YILMAZ, M.D. Layer-by-layer hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte coated mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocontainers for optical bleaching of cellulose fabrics. **Carbohydrate Polymers**, 146, 174–180. 2016.

BORDAS O.X. Tratamiento tópico de la psoriasis. **Revisión de publicaciones recientes**. Piel, 18(9), 509–514. 2003.

BHOSALE, M.A., & BHANAGE, B.M. A facile one-step approach for the synthesis of uniform spherical Cu/Cu₂O nano- and microparticles with high catalytic activity in the Buchwald–Hartwig amination reaction. **RSC Adv.**, 4(29), 15122–15130. 2014.

HOEGSBERG, T. et al. Topical treatment of psoriasis: questionnaire results on topical therapy as long-term continuous treatment and use on specific body sites. **The Journal of dermatological treatment**, Mar 6:1-6. 2020.