

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS LÍQUIDO-  
CRISTALINOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA DE METOTREXATO: ESTUDO  
DA BIOADESÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO***

**Larissa Alvarenga Pinto**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli**

Araraquara

2012

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de ilustrações</b> .....	<b>4</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>19</b>
3.1 Preparação das formulações .....	19
3.2 Ensaio de bioadesão .....	21
3.3 Microscopia de luz polarizada .....	22
3.4 Determinação do comportamento reológico .....	23
3.5 Ensaio de citotoxicidade .....	23
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	<b>25</b>
4.1 Ensaio de bioadesão .....	25
4.2 Microscopia de luz polarizada .....	31
4.3 Determinação do comportamento reológico .....	33
4.4 Ensaio de citotoxicidade .....	35
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b> .....	<b>39</b>

## Resumo

A psoríase é uma doença inflamatória relativamente comum da pele e das articulações, podendo se tornar crônica. Nos últimos anos, a expansão do arsenal terapêutico para o paciente com psoríase tem permitido aos médicos combaterem, de forma mais agressiva, a patogênese da doença. Um fármaco utilizado para o tratamento é o metotrexato, que, apesar de ser bastante eficaz, possui potencial para a toxicidade sistêmica, como toxicidade hematológica, hepática e pulmonar. Sendo assim, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de novos veículos com o objetivo não só de aumentar a eficácia terapêutica de substâncias ativas, como também de permitir a redução da sua dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos. Os cristais-líquidos são sistemas promissores para aplicação tópica, pois promovem liberação controlada de fármacos, contribuindo para amenizar efeitos adversos, por exemplo, do metotrexato. Uma vez que há possibilidade de as substâncias incorporadas em formulações tópicas serem absorvidas pela pele e mucosas, existe a necessidade de garantir que as formulações sejam seguras. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a bioadesão e a citotoxicidade *in vitro* de três sistemas líquido-cristalinos contendo metotrexato para o tratamento da psoríase. Resultados de bioadesão revelaram que as três formulações analisadas apresentaram forças bioadesivas próximas, sendo o sistema A mais bioadesivo. Com relação a estudos de reologia, houve comportamento de fluido não-newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico. Além disso, a adição de metotrexato à formulação A, aumentou a viscosidade do sistema. Ensaio de citotoxicidade sugerem a possibilidade de liberação prolongada de metotrexato, contribuindo para o aumento da viabilidade celular.

## Lista de ilustrações

**Figura 1:** Disposição da pele no analisador de textura e uma curva de força x tempo obtida do teste de bioadesão

**Figura 2:** Gráfico da força de adesão das formulações A, B, C e do Carbopol 0,5% e 1%. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão

**Figura 3.** Fotomicrografia da formulação A sem MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 4.** Fotomicrografia da formulação A com MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 5.** Fotomicrografia da formulação B sem MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 6.** Fotomicrografia da formulação B com MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 7.** Fotomicrografia da formulação C sem MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 8.** Fotomicrografia da formulação C com MTX (Aumento de 40 x)

**Figura 9.** Curva de fluxo das formulações com e sem MTX dada pelo teste realizado no Rheostress RS1 rheometer, Haake, Karlsruhe, Germany, com o software Rheowin 3,5, com um sensor de geometria cone-placa de 40 mm de diâmetro, gap 52  $\mu$ m e ângulo 2°, à temperatura de 32°C

**Figura 10.** Gráfico da viabilidade de células HaCat tratadas com soluções de MTX em NaOH 0,1 N por 24, 36 e 48 horas (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

**Figura 11.** Gráfico da viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação A por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

**Figura 12.** Gráfico da viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação B por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

**Figura 13.** Gráfico da viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação C por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Composição dos SLC constituídos por poliéter funcional siloxano (tensoativo), silicone fluido de copolímero glicol (F.O.), água (F.A.) e metotrexato e do controle positivo composto por Carbopol 0,5% e 1,0%, água e trietanolamina (TEA).

**Tabela 3.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação A. (A1 – A6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação A). (CV%: coeficiente de variação)

**Tabela 4.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação B. (B1 – B6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação B). (CV%: coeficiente de variação)

**Tabela 5.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação C. (C1 – C6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação C). (CV%: coeficiente de variação)

**Tabela 6.** Pico de adesão e trabalho de adesão do Carbopol 0,5%. (Carbopol 1 – Carbopol 6 são 6 amostras contendo 2 g do Carbopol 0,5%). (CV%: coeficiente de variação)

**Tabela 7.** Pico de adesão e trabalho de adesão do Carbopol 1,0%. (Carbopol 1 – Carbopol 6 são 6 amostras contendo 2 g do Carbopol 1,0%). (CV%: coeficiente de variação)

## **Lista de abreviaturas**

**1/s:** um por segundo – unidade de taxa de cisalhamento

**%:** porcentagem

**°:** graus

**°C:** graus Celsius

**cm<sup>2</sup>:** centímetro quadrado

**CL:** cristal líquido

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**dTMP:** ácido desoxitimidílico

**EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético

**F.A.:** fase aquosa

**FBS:** Soro Fetal Bovino

**F.O.:** fase oleosa

**g:** grama

**µm:** micrômetro

**mg:** miligrama

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**N:** Newton – unidade de força bioadesiva

**N:** normal

**nm:** nanômetro

**N.s:** Newton vezes segundo – unidade de trabalho de adesão

**MTX:** metotrexato

**Pa:** Pascal – unidade de tensão de cisalhamento

**PBS:** tampão fosfato salino

**pH:** potencial hidrogeniônico

**pKa:** constante de dissociação

**qsp:** quantidade suficiente para

**RNA:** ácido ribonucleico

**rpm:** rotações por minuto

**s:** segundo

**SLC:** sistemas líquido-cristalinos

**TEA:** trietanolamina

**x:** versus



## 1. Introdução

A psoríase é uma doença inflamatória relativamente comum da pele e articulações, de predisposição genética e origem multifatorial que afeta, aproximadamente, 2% da população geral dos Estados Unidos e 1,5% da população espanhola (CARRETERO et al., 2010). Enquanto que a psoríase pode ocorrer em qualquer idade, para muitos sintomas clínicos, apresenta início na fase adulta. A psoríase pode se desenvolver em uma doença debilitante crônica com impactos na qualidade de vida contribuindo significativamente para os custos com a saúde. As formas moderada a severa frequentemente necessitam de terapias sistêmicas de longo-prazo para aliviar os sintomas (MENTER et al., 2008; KRUGER et al., 2001).

A patofisiologia da doença envolve uma ativação anormal do sistema imune caracterizada pelo aumento da atividade de células T, de antígenos presentes nas células (ex.: células dendríticas e citocinas Th1), e linfócitos B (KRUGER et al., 2005). Isto ocorre quando o sistema imune reconhece erroneamente as células da pele como patógenos, e transmite sinais defeituosos que aceleram o crescimento e divisão das células da pele, resultando em um eritema bem definido junto de tonalidades vermelha e branca de manchas escamosas que aparecem na camada superior da epiderme.(ANDREW et al., 2004).

Pacientes com psoríase possuem seus níveis aumentados de estresse, ansiedade, depressão e irritação. Tratamentos de primeira linha têm sido desenvolvidos para psoríase, porém são menos efetivos devido à baixa penetração, por serem cosmeticamente inaceitáveis e inconvenientes para uso em longo prazo ou associados com uma toxicidade significativa (MENDONCA & BURDEN, 2003).

No Brasil não existem estudos sobre a sua prevalência. A sua forma mais comum, chamada de psoríase vulgar, manifesta-se principalmente por placas eritemato-escamosas, bem delimitadas, ocasionalmente pruriginosas, em áreas de traumas constantes na pele, como cotovelos, joelhos e couro cabeludo. Ocasionalmente, as articulações podem ser prejudicadas, ocorrendo a denominada artrite psoriásica (MARTINS & ARRUDA, 2004; THIELEN & LAFFITTE, 2009).

A maioria dos pacientes com psoríase pode ser tratada com medicamentos de uso tópico, porém há formas graves que necessitam de medicamentos de uso sistêmico, como os agentes citotóxicos e os imunossupressores (BATCHELOR, INGRAM & WILLIAMS, 2009; MENTER et al., 2009).

A administração de medicamento diretamente sobre a lesão cutânea permite minimizar possíveis efeitos colaterais em outros órgãos e na pele não lesada. Nas formas leves de psoríase, a terapêutica tópica, seja em monoterapia, seja combinada, costuma ser suficiente para o controle das lesões. Nas formas moderadas a graves, o tratamento local, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, propicia mais conforto ao paciente e acelera a melhora (CARRASCOSA et al., 2009; NALDI & RAHO, 2009).

Em 1972, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou pela primeira vez a indicação do metotrexato (MTX) para o tratamento da psoríase.

O fármaco possui tripla ação: anti-inflamatória, anti-proliferativa e imunossupressora. O mecanismo de ação está relacionado com a interferência na via metabólica do ácido fólico, inibindo competitivamente a enzima dihidrofolato redutase e por fim sua conversão a ácido folínico. O MTX se liga fortemente à enzima, sendo essa fixação reversível, de maneira que se necessita de grande quantidade de moléculas de fármaco em contato para a manutenção da inibição,

pois do contrário, a união se dissocia e a enzima recupera sua atividade. Esta inibição impede a síntese do ácido desoxitimidílico (dTMP), indispensável para a síntese de DNA, assim ocorre inibição da mitose e da proliferação de células de divisão rápida, como as da epiderme e da medula óssea. (BÉRARD & NICOLAS, 2003; GRIFFITHS, CAMP & BARKER, 2005; DARABI et al., 2009; KALB et al., 2009). Sua ação é mais marcante sobre populações celulares em fase de crescimento exponencial, o que explica efeito seletivo sobre células tumorais e ação sobre tecidos em proliferação, como no caso da psoríase. A eficácia do MTX deve-se também às suas propriedades imunomoduladoras, freando a produção de interleucina-1 e diminuindo a densidade de células de Langherhans na epiderme (MARTINS & ARRUDA, 2004).

Além disso, embora com menor sensibilidade, o MTX é capaz de inibir parcialmente a formação do anel púrico do ácido inosínico, precursor de todos os nucleotídeos de purinas, tanto do DNA quanto do RNA. Acrescenta-se que concentrações altas de MTX podem chegar a inibir diretamente a síntese de proteínas.

Utilizado em doses altas, seu principal efeito é a ação antifolato, contudo seu mecanismo em doses baixas não está claro, e se sugere que pode estar relacionado com a capacidade de formar poliglutamatos intracelulares (poliglutamação) e aumentar a formação de adenosina, por inibir enzimas que metabolizam purinas, sendo a adenosina um potente mediador anti-inflamatório endógeno (WARREN et al., 2008). Há também, em doses baixas, a alteração da ativação de células T e a inibição da ativação e expressão de certas moléculas de adesão por parte dessas células (JOHNSTON et al., 2005; TORRES-ÁLVAREZ et al., 2007; SIGMUNSDOTTIR et al., 2004).

Quanto às suas propriedades físicas, o MTX caracteriza-se por ser um pó cristalino amarelado, com ponto de fusão entre 182 a 189°C e peso molecular de 454,4. É praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e éter, e bastante solúvel em soluções diluídas de hidróxidos de álcalis e carbonatos (CLARKE et al., 2007).

Quimicamente é constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4-diamino substituído) ligada à porção p-aminobenzoil que, por sua vez, está ligada à unidade de ácido glutâmico. A molécula é um polieletrólito com dois grupos carboxílicos cujas constantes de dissociação (pKa) são de 3,36 ( $\alpha$ -carboxil) e 4,70 ( $\gamma$ -carboxil), além de uma variedade de funções nitrogenadas, onde a mais básica é provavelmente o grupamento N-1 guanídico do anel pterina (pKa 5,71). Sua solubilidade aquosa é pH dependente, variando de 0,9 mM em pH 5 até 20 mM em pH 7. A principal diferença estrutural do MTX em relação ao seu análogo ácido fólico é a substituição de uma hidroxila por uma amina no C-2 e uma metilação no N-10 (RUBINO, 2001; SIZTO et al., 2009).

O MTX é uma das substâncias mais utilizadas no tratamento da psoríase devido à sua eficácia, baixo custo e comodidade posológica, podendo ser administrado por via oral ou parenteral. A dose semanal habitual de 7,5 a 25 mg reduz o risco de toxicidade aguda.

Quando administrado por um longo período, vários efeitos colaterais podem ocorrer, tais como: toxicidade pulmonar, ulceração da mucosa, estomatites, supressão da medula óssea, perda de apetite, indução de fibrose cística e cirrose. (FRANK e ALAN, 2004). Para reduzir os efeitos adversos, a administração tópica de metotrexato é preferida (TROTTA et al., 2004; CARRETERO et al., 2010).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm demonstrado interesse no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como os sistemas líquido-cristalinos (SLC), os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ, 2006; GUTERRES et al., 2007).

Também conhecidos como “estados mesomórficos”, os SLC apresentam propriedades tanto de sólidos quanto de líquidos. Possuem ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (MÜLLER-GOYMANN, 2004; SANTOS et al., 2005; CHORILLI et al., 2009).

Os SLC podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos são constituídos por moléculas individuais e não outras espécies moleculares (especificamente moléculas de solvente) são necessárias para a formação da base do cristal líquido (CL). São pouco estáveis e a temperatura é um parâmetro termodinâmico fundamental para a formação desses sistemas. Os liotrópicos são misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água. Além disso, a construção da fase liotrópica é frequentemente não por uma, mas por várias moléculas (tipicamente da ordem de 100) organizadas num agregado denominado micela. A formação de micelas é um resultado do caráter anfifílico das moléculas constituintes, geralmente tensoativos. Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e comumente observadas são lamelar, hexagonal e cúbica (LEE et al., 2009; LI et al., 2009).

A fase lamelar é formada por camadas paralelas de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede uni ou bidimensional. Na

fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bi ou tridimensionais. Fases cúbicas liotrópicas, por sua vez, apresentam estruturas mais complicadas de serem visualizadas, geralmente de simetria cúbica, apesar de as fases romboédricas e tetragonais também serem detectadas em alguns sistemas (JOHNSSON et al., 2006; FARKAS, KISS & ZELKÓ, 2007).

Com o foco de hoje da ciência dos materiais nanoestruturados na capacidade dos cristais líquidos termotrópicos, bem como os liotrópicos de se auto-organizarem em estruturas que exibem específicos arranjos em nanoescala e que permanecem numa forma ordenada por muito mais tempo, descobriu-se que os cristais líquidos são extremamente atraentes (LAGERWALI et al., 2012).

Ao substituir o CL termotrópico por uma fase liotrópica adequada e por diminuir o tamanho da partícula para submícrons, produz-se sistemas com aplicação potencial no campo das ciências Farmacêuticas (YAGHMUR et al., 2009; SAGALOWICZ et al., 2006; BARAUSKAS et al., 2005; MEZZENGA et al., 2005; SPICER, 2005).

A fase de CL é contida numa fina camada de um bloco anfifílico de copolímero. Essas nanopartículas, geralmente são preparadas através de ultrasonicador fornecendo diâmetros de 100 nm, sendo referidos como cubossomos ou hexassomos que podem carregar fármacos.

O interesse por esses sistemas possui diversas origens (FAROKHZAD et al., 2005; MALMSTEN, 2006). Primeiro, porque o núcleo da partícula contém quantidades aproximadamente iguais de regimes polares e não polares, então as partículas podem transportar fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos, ou até mesmo ambos simultaneamente. Uma segunda vantagem importante é que os fármacos são

protegidos no núcleo da partícula da degradação química ou enzimática do organismo.

Uma forma menos avançada tecnologicamente no emprego do CL para liberação de fármaco está na aplicação tópica ou outra direta (SAVIC et al., 2005; MULLER-GOYMANN et al., 2004). A alta viscosidade do CL auxilia na localização do fármaco, por exemplo, na pele, por via subcutânea, intramuscular ou nas cavidades corporais, como a boca. Além disso, as transições entre as diferentes fases líquidas cristalinas induzidas pela mudança de temperatura ou concentração permitem uma dinâmica afinação das propriedades, como consistência e estabilidade. Por exemplo, creme para a pele pode ser em uma fase cúbica ou hexagonal à temperatura ambiente, mas derreter a lamelar através do aquecimento de fricção, permitindo a administração rápida e simples e, posteriormente pode se reordenar com o arrefecimento. Outro exemplo é de uma solução de baixa viscosidade que contém pouca água e que se transforma numa fase líquida cristalina viscosa quando misturada com água no local de destino que neste caso, seria tipicamente da boca. Desta maneira, o fármaco pode ser manuseado e aplicado facilmente e permanecer no local uma vez administrado (LAGERWALL et al., 2012).

Por se tratar de um estudo realizado na pele, faz-se necessário a avaliação da bioadesão.

A bioadesão é utilizada para descrever um fenômeno que está relacionado com a capacidade presente em algumas macromoléculas sintéticas ou biológicas em aderir a tecidos biológicos (CARVALHO et al., 2010). O uso potencial de sistemas bioadesivos como transportadores de fármacos se deve ao prolongamento do tempo de residência no sítio de absorção, permitindo um contato intensificado

com a barreira epitelial, diminuindo a frequência de administração e aumentando a adesão do paciente à terapia. (CARVALHO et al., 2010).

A bioadesão pode ser realizada utilizando pele de orelha de porco. Estudos anteriores demonstraram que pele de porco é um modelo aceitável para a barreira da pele humana. (SEKKAT et al., 2002; JACOBI et al., 2007). A pele de porco é muitas vezes utilizada para avaliar formulações farmacêuticas tópicas e transdérmicas seja *in vivo* ou *in vitro*. Existem significativas similaridades entre certas propriedades da pele de porco e da humana (exemplo: espessura epidérmica e composição lipídica), além da permeabilidade das membranas para diversos compostos. A pele excisada da orelha de porco tornou-se cada vez mais utilizada para aplicações *in vitro* (SEKKAT et al., 2002).

A quantidade de metodologias aplicadas para analisar a bioadesão está em constante crescimento. Um método de medição de bioadesão é através da utilização de um Analisador de Textura. Este é um instrumento versátil capaz de medir as forças de compressão ou de extensão, e pode ser programado com tempos de espera e de saída diferentes através do computador (THIRAWONG et al., 2007).

A reologia adquiriu posição permanente nos testes de estabilidade, uma vez que as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico, interferindo na forma de utilização do produto, na adesão ao tratamento e, também, na aceitação do produto pelo consumidor.

A caracterização reológica completa de um sistema pode, então, ser útil desde o desenvolvimento do produto até a determinação do prazo de validade, incluindo influência em testes sensoriais, que auxiliam verificar a aceitação do consumidor (ARCHONODO, 2003).



Nos estudos de reologia existem os sistemas denominados Newtonianos e os não-Newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não Newtoniano, que normalmente é representado por 3 tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (ANSEL, 2000).

Para as formulações dérmicas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (SCHOTT, 1995). A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001). Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (ALMEIDA, Bahia, 2003).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de medicamentos para uso humano (ROGERO et al., 2003).

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de medicamentos, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o medicamento direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais

facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto (ROGERO et al., 2003).

Muitas empresas farmacêuticas estão investindo em testes *in vitro* revelando serem mais econômicos e eticamente aceitáveis que testes *in vivo* (FRESHNEY, 2005).

Numerosos ensaios têm sido desenvolvidos para medir a citotoxicidade, tais como: avaliação de crescimento clonogênico, incorporação com precursores de radioisótopos como [<sup>3</sup>H] timidina e [<sup>3</sup>H] leucina, extravasamento pela membrana de enzimas citoplasmáticas e uma variedade de procedimentos colorimétricos incluindo azul de tripan, cristal violeta e vermelho neutro. Muitas dessas técnicas são limitadas pelas restrições técnicas, particularmente quando um alto rendimento é requerido. Muitas exigem trabalho intenso com longos tempos de processamento, algumas são sujeitas a artefatos e pouco reprodutíveis.

O sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) é amplamente utilizado para quantificar a citotoxicidade de preparações por ensaio colorimétrico. O sal de tetrazólio é metabolicamente reduzido a produtos finais altamente coloridos chamados formazanas (Mosmann, 1983). O MTT é clivado a formazana pelo sistema succinato-tetrazólio redutase o qual pertence à cadeia respiratória mitocondrial e é ativo somente em células viáveis (HOPER, 1997).

As amostras são avaliadas quando às suas funções na pele, sendo necessário realizarem-se culturas com células da pele, tais como as da linhagem HaCat a qual se trata de queratinócito epidermal humano imortalizado. Essa linhagem foi estabelecida por Fusening (BOUKAMP et al., 1988) e é amplamente utilizada por possuir facilidade de propagação e por ter um fenótipo próximo ao normal (DEYRIEUX et al., 2007).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Espera-se obter resultados de bioadesão e de citotoxicidade *in vitro* para um sistema de liberação líquido-cristalino contendo metotrexato para o tratamento tópico da psoríase.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Dentre os objetivos específicos do presente trabalho, estão:

- Realização de ensaios de bioadesão
- Ensaios de microscopia de luz polarizada
- Ensaios de comportamento reológico
- Ensaios de citotoxicidade

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Preparação das formulações**

Preparou-se 3 formulações constituídas de poliéter funcional siloxano (tensoativo), silicone fluido de copolímero glicol (óleo ou fase oleosa) e água (fase aquosa), totalizando 20g de cada formulação para o ensaio de bioadesão.

Primeiramente, solubilizou-se o metotrexato em 1mL de NaOH 0,1N para a posterior incorporação na fase aquosa. Logo após, o tensoativo foi adicionado seguido pela fase oleosa. Então, levou-se as formulações ao banho-maria à 40°C por 5 minutos, agitando-se com bagueta de vidro para homogeneização. As formulações foram deixadas em repouso por 24h em temperatura ambiente.

A fim de comparar a bioadesividade das amostras com um controle positivo, no momento do ensaio de bioadesão, preparou-se duas formulações, contendo 200g de cada, constituídas por Carbopol 0,5% e Carbopol 1,0%, pois este composto é

utilizado como padrão de comparação por apresentar elevados valores de bioadesão. As composições dos SLC em estudo e do controle positivo encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição dos SLC constituídos por poliéter funcional siloxano (tensoativo), silicone fluido de copolímero glicol (F.O.), água (F.A.) e metotrexato.

<b>SLC</b>	<b>Tensoativo (%)</b>	<b>F.O. (%)</b>	<b>F.A. (%)</b>	<b>MTX (%)</b>
<b>A</b>	25	40	33,75	1,25
<b>B</b>	30	40	28,75	1,25
<b>C</b>	35	40	23,75	1,25

Foi usado como controle positivo uma dispersão de carbopol a 0,5% (1g de Carbopol 974, 199 mL de água e trietanolamina q.s.p. pH 6) e também uma dispersão de carbopol a 1% (2g de Carbopol 974, 198 mL de água e trietanolamina q.s.p. pH 6).

Após 24 horas, as formulações A, B e C foram submetidas ao aquecimento de 32°C para os ensaios de bioadesão. O controle positivo contendo Carbopol 0,5% e 1,0% também foi aquecido à mesma temperatura.

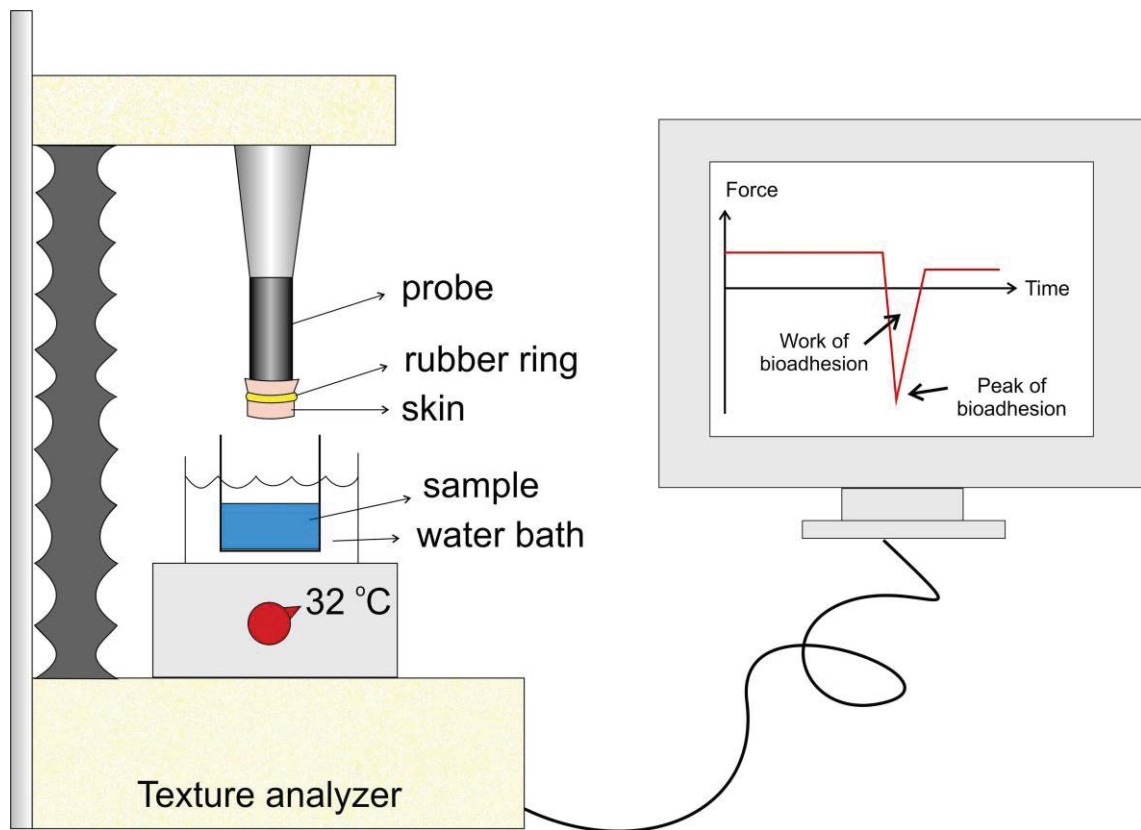
### **3.2 Ensaio de bioadesão**

Para este ensaio, utilizou-se pele de orelha de porco, obtida do Frigorífico Olhos d'Água logo após o abate rotineiro de animais para o consumo.

A pele de porco foi descongelada por trinta minutos, os pelos cortados com tesoura e, em seguida, a pele foi hidratada com solução de NaCl 0,9% por quinze minutos.

Utilizou-se o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®) para avaliar a bioadesão das formulações e compará-las com o controle positivo composto por Carbopol 0,5% e 1,0%. Então, um pequeno fragmento da pele de orelha de porco descongelada e hidratada foi ligado, por meio de um anel de borracha, à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10mm de diâmetro) do analisador de textura. Em seguida, 6 amostras contendo em torno de 2g de cada formulação e do controle positivo foram colocadas em banho-maria a 32°C. O teste foi realizado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até a pele entrar em contato com a amostra. Pele e amostra ficaram em contato por 60 segundos. Após esse tempo a sonda se afastou da amostra numa velocidade de 0,5 mm/s e, então durante a medição foi realizada uma curva força-tempo a partir do trabalho de adesão – área sob a curva força-distância na fase de afastamento da sonda e um pico de adesão foi calculado.

A Figura 1 descreve a disposição na sonda do analisador de textura da pele e uma curva qualquer força x tempo obtida do teste de bioadesão.



**Figura 1.** Disposição da pele no analisador de textura e uma curva de força x tempo obtida do teste de bioadesão

### 3.3 Microscopia de luz polarizada

Cerca de 40 mg das formulações A, B e C foram colocados sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisados com auxílio de microscópio de luz polarizada Carl Zeiss modelo Axioskop 40. Com o auxílio da luz polarizada observou-se a presença de prováveis áreas de anisotropia (áreas que desviam o plano da luz polarizada) que indicam a presença de sistemas líquido-cristalinos.

### **3.4 Determinação do comportamento reológico**

Avaliou-se a propriedade de fluxo empregando o reômetro Rheostress RS1 rheometer, Haake, Karlsruhe, Germany, e o software Rheowin 3,5, com um sensor de geometria cone-placa de 40 mm de diâmetro, gap 52  $\mu\text{m}$  e ângulo 2°, à temperatura de 32°C. Para este teste, colocou-se uma pequena amostra de CL entre o cone e a placa.

Para a medida de escoamento de fluxo o gradiente de velocidade crescente foi de 0 a 100 (1/s) e o gradiente de velocidade decrescente foi de 100 a 0 (1/s).

### **3.5 Ensaios de citotoxicidade**

Primeiramente, utilizou-se uma cultura de células HaCat que estavam em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> de área de superfície de contato celular. Então, essas células foram tripsinizadas (tripsina 0,05% e EDTA 2 mM, GIBCO Co., Brasil) em fluxo laminar vertical da seguinte maneira: o meio foi desprezado e a garrafa lavada com tampão fosfato salino 1X (PBS 1X, contendo 137 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato, 2,7 mM de cloreto de potássio e pH de 7,4). 5 mL de tripsina foi colocada no interior da garrafa que ficou na estufa por 5 minutos. Em seguida, pela observação ao microscópio viu-se que as células se soltaram do fundo da garrafa. Colocou-se 2 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) suplementado com FBS (*Fetal Bovine Serum*, Cultilab) na garrafa e homogeneizou. Transferiu esse conteúdo da garrafa para tubo de polipropileno de 15 mL, o qual foi centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células formado no fundo do tubo de polipropileno foi ressuspenso em 3 mL de DMEM. Uma alíquota de 10 microlitros dessa suspensão foi retirada e colocada

numa câmara de Neubauer para a contagem de células. Após a contagem, foi feita uma diluição com meio de cultura, a fim de se obter  $2,5 \times 10^4$  células/mL.

Para o ensaio de MTT, foram necessários três dias. No primeiro, realizou-se o plaqueamento das células na concentração acima, em placas de 96 poços. Estas, foram incubadas em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. O segundo dia destinou-se ao tratamento com as formulações sem e com MTX e fármaco solubilizado em NaOH 0,1N. Deixou-se a placa em estufa a 37°C por 24, 36 e 48 horas para avaliar a liberação do MTX dos SLC para as células.

No último dia de experimento, retirou-se o meio e foi preparada uma solução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], Sigma) de concentração 5 mg/ml. Para isto, pesou-se 10 mg de MTT que, posteriormente, foi solubilizado em 2 ml de PBS 1X. Adicionou-se 20 microlitros dessa solução em todos os poços. Em seguida, a placa foi embrulhada em papel alumínio e incubada por 3 horas em estufa a 37°C. Após esse tempo, retirou-se toda a solução de MTT e adicionou 100 microlitros de dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 540 nm (BIO RAD iMark™ Microplate Reader).

A viabilidade celular foi calculada pela equação 1:

$$\text{Viabilidade} = \frac{(\text{Abs T} - \text{CB})}{(\text{CN} - \text{CB})} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Em que:

Abs T : absorbância do teste

CB : absorbância do controle branco

CN : absorbância do controle negativo



As formulações A, B e C foram testadas com as seguintes concentrações de MTX nos SLC solubilizados em DMEM:  $24,414 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L ,  $12,207 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L e  $6,104 \times 10^{-1}$  mg/ 100  $\mu$ L. Soluções de liberação imediata contendo MTX solubilizado nas mesmas concentrações acima em NaOH 0,1N também foram analisadas. Sendo assim, o controle negativo utilizado para o cálculo de viabilidade celular das formulações constituiu-se pelo cristal líquido sem MTX adicionado às células em DMEM, já o controle negativo referente à viabilidade da solução de MTX foi composto por células e DMEM. O controle positivo para as formulações foi a solução de  $24,414 \times 10^{-1}$  mg de MTX em NaOH 0,1 N que ficou em contato com as células por 48 horas.

#### **4. Resultados e discussão**

##### **4.1 Ensaio de bioadesão**

Os resultados dos ensaios de bioadesão realizados no texturômetro estão apresentados nas Tabelas 3 a 7, que contém os picos de adesão e trabalhos de adesão encontrados nos gráficos de força x tempo plotados pelo computador do equipamento para as formulações e para o Carbopol.

A Tabela 3 exibe os resultados de bioadesão da formulação A.

**Tabela 3.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação A. (A1 – A6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação A) (CV%: coeficiente de variação).

<b>Formulação</b>	<b>Pico de adesão (N)</b>	<b>Trabalho de adesão (N.s)</b>
<b>A1</b>	0,4	1,664
<b>A2</b>	0,4	1,883
<b>A3</b>	0,5	1,892
<b>A4</b>	0,4	1,862
<b>A5</b>	0,5	2,28
<b>A6</b>	0,5	2,171
<b>Média</b>	0,45	1,958666667
<b>Desvio padrão</b>	0,054772256	0,22569153
<b>CV %</b>	12,17161239	11,52271255

Observou-se que as 6 amostras apresentaram picos e trabalhos de adesão semelhantes, sendo que a média do pico de adesão foi 0,45 N, e a média do trabalho de adesão foi 1,96 (N.s). Os desvios-padrão apresentaram valores baixos. Observou-se que esta formulação foi a que se apresentou mais bioadesiva comparada com B e C.

A Tabela 4 exibe os resultados de bioadesão para a formulação B.

**Tabela 4.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação B. (B1 – B6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação B). (CV%: coeficiente de variação).

<b>Formulação</b>	<b>Pico de adesão (N)</b>	<b>Trabalho de adesão (N.s)</b>
<b>B1</b>	0,4	1,653
<b>B2</b>	0,4	1,889
<b>B3</b>	0,4	1,697
<b>B4</b>	0,3	1,736
<b>B5</b>	0,4	1,98
<b>B6</b>	0,4	1,966
<b>Média</b>	0,383333333	1,820166667
<b>Desvio padrão</b>	0,040824829	0,14265401
<b>CV %</b>	10,6499554	7,837414724

Observou-se que as 6 amostras apresentaram picos e trabalhos de adesão semelhantes, sendo que a média do pico de adesão foi 0,38 N, e a média do trabalho de adesão foi 1,82 N.s. Os desvios-padrão apresentaram valores baixos. Esta formulação é menos bioadesiva comparada às formulações A e C.

Os resultados de bioadesão da formulação C encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Pico de adesão e trabalho de adesão da formulação C (C1 – C6 são 6 amostras contendo 2 g da formulação C) (CV%: coeficiente de variação).

<b>Formulação</b>	<b>Pico de adesão (N)</b>	<b>Trabalho de adesão (N.s)</b>
<b>C1</b>	0,3	1,432
<b>C2</b>	0,4	2,165
<b>C3</b>	0,4	1,847
<b>C4</b>	0,4	1,995
<b>C5</b>	0,5	2,116
<b>C6</b>	0,4	1,984
<b>Média</b>	0,4	1,923166667
<b>Desvio padrão</b>	0,063245553	0,265169694
<b>CV %</b>	15,8113883	13,78818064

Observou-se que as 6 amostras apresentaram picos e trabalhos de adesão semelhantes, sendo que a média do pico de adesão foi 0,4 N, e a média do trabalho de adesão foi 1,92 N.s. Os desvios-padrão apresentaram valores baixos. Esta formulação apresenta bioadesividade intermediária entre A e B.

Os valores do pico de adesão e do trabalho de adesão para o Carbopol 0,5% encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Pico de adesão e trabalho de adesão do Carbopol 0,5%. (Carbopol 1 – Carbopol 6 são 6 amostras contendo 2 g do Carbopol 0,5%). (CV%: coeficiente de variação).

	<b>Pico de adesão (N)</b>	<b>Trabalho de adesão (N.s)</b>
<b>Carbopol 1</b>	2	6,85
<b>Carbopol 2</b>	2,6	8,472
<b>Carbopol 3</b>	3	8,058
<b>Carbopol 4</b>	3,1	7,813
<b>Carbopol 5</b>	2,4	7,898
<b>Carbopol 6</b>	3,3	11,066
<b>Média</b>	2,733333333	8,3595
<b>Desvio padrão</b>	0,488535226	1,429610821
<b>CV %</b>	17,87323996	17,10163073

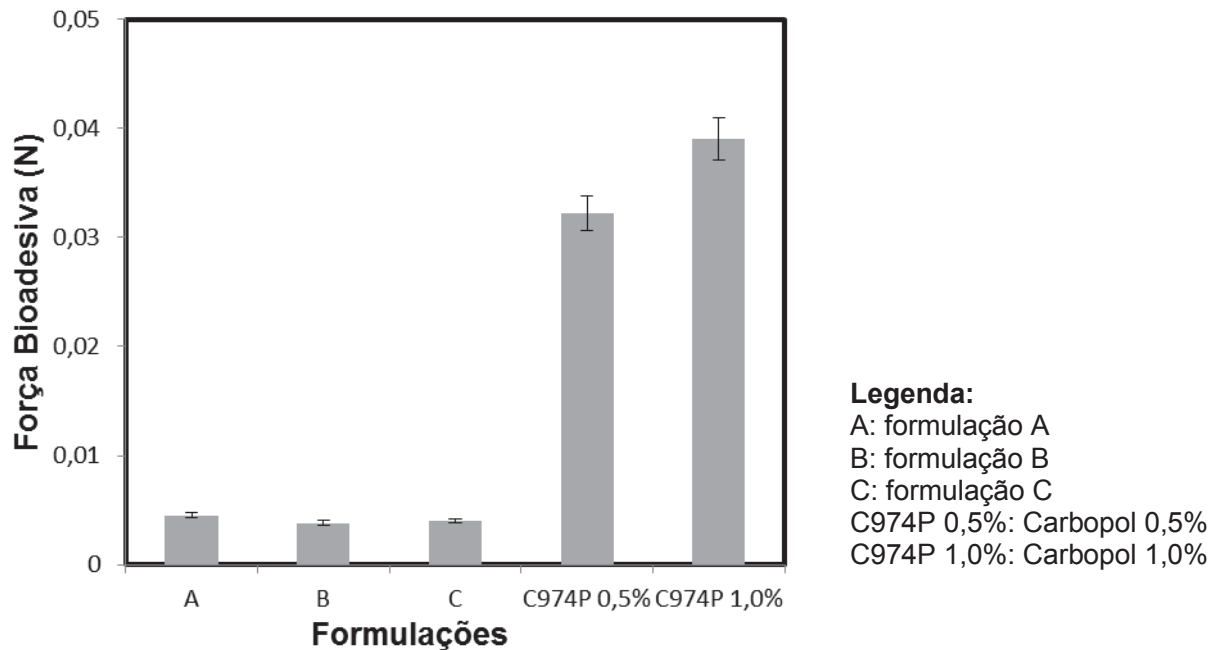
Observou-se que o Carbopol 0,5% apresenta elevada bioadesão comparada com os SLC A, B e C. Porém, ao comparar com a bioadesão do Carbopol 1,0 %, constatou-se que a 0,5%, o Carbopol é menos bioadesivo.

Os valores do pico de adesão e do trabalho de adesão para o Carbopol 1% encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7.** Pico de adesão e trabalho de adesão do Carbopol 1,0 %. (Carbopol 1 – Carbopol 6 são 6 amostras contendo 2 g do Carbopol 1,0 %). (CV%: coeficiente de variação).

	<b>Pico de adesão (N)</b>	<b>Trabalho de adesão (N.s)</b>
<b>Carbopol 1</b>	4,5	15,611
<b>Carbopol 2</b>	4	13,314
<b>Carbopol 3</b>	4	12,977
<b>Carbopol 4</b>	2,3	12,791
<b>Carbopol 5</b>	3,1	10,713
<b>Carbopol 6</b>	2,8	9,808
<b>Média</b>	3,45	12,53566667
<b>Desvio padrão</b>	0,845576726	2,053568958
<b>CV %</b>	24,50947033	16,38180891

Plotou-se o gráfico contendo a força bioadesiva das formulações A, B e C e do Carbopol 0,5% e 1,0% (Figura 2).



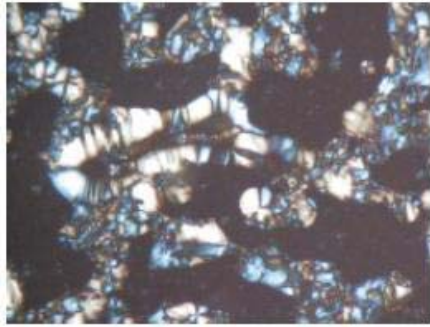
**Figura 2.** Gráfico da força de adesão das formulações A, B, C e do Carbopol 0,5% e 1%. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão.

As formulações contendo metotrexato apresentaram pequenos desvios-padrão e forças, picos e trabalhos de adesão próximos, sendo que a formulação A possui as maiores forças bioadesivas. Comparando-se os SLC com o Carbopol, verificou-se que este apresenta elevada bioadesão, visto que o composto é utilizado em formas farmacêuticas tópicas por apresentar propriedades viscosificantes, gelificantes e por ser um polímero promotor de bioadesão.

#### 4.2 Microscopia de luz polarizada

Verificou-se que as três formulações escolhidas sem e com a incorporação de MTX (Figuras 3, 5 e 7 e Figuras 4, 6 e 8, respectivamente) apresentaram regiões de anisotropia, indicadas pela presença de fases líquido-cristalinas lamelares em sua estrutura, evidenciada pelo surgimento de estruturas denominadas “cruzes de

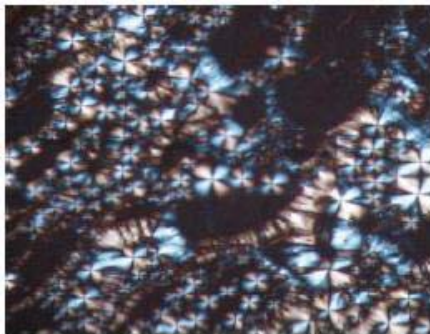
malta”, as quais são características de fase lamelar. Percebeu-se também que a incorporação do fármaco não alterou a estrutura interna lamelar das formulações.



**Figura 3.** Fotomicrografia da formulação A sem MTX (aumento de 40x)



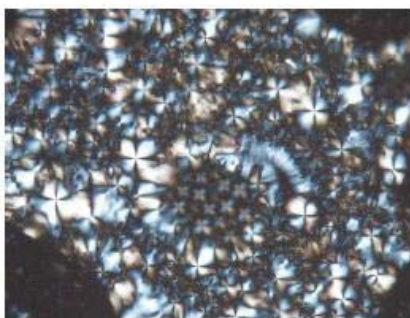
**Figura 4.** Fotomicrografia da formulação A com MTX (aumento de 40x)



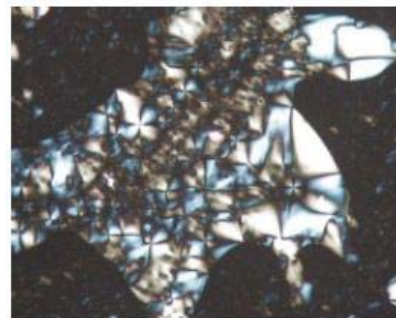
**Figura 5.** Fotomicrografia da formulação B sem MTX (aumento de 40x)



**Figura 6.** Fotomicrografia da formulação B com MTX (aumento de 40x)



**Figura 7.** Fotomicrografia da formulação C sem MTX (aumento de 40x)



**Figura 8.** Fotomicrografia da formulação C com MTX (aumento de 40x)



### 4.3 Determinação do comportamento reológico

De acordo com a Figura 9, as formulações apresentaram perfil de fluido não newtoniano, pois não apresentaram linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, ou seja, tensão e taxa não são diretamente proporcionais. Esses resultados revelam a presença de uma rede estruturada formada de uma interação entre os componentes da formulação, a qual é gradualmente quebrada com o aumento da tensão de cisalhamento. Sendo assim, a resistência interna da estrutura do sistema diminui causando a alteração na viscosidade (NÉMETH et al., 1998).

As formulações também são classificadas como fluido pseudoplástico. A literatura mostra que fluidos pseudoplásticos apresentam diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006). A pseudoplasticidade é adequada para produtos indicados para uso tópico, pois após a aplicação da tensão, a formulação tem sua viscosidade reduzida, apresentando facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea (CHORILLI, 2007).

Observa-se pelo gráfico da Figura 9 que há duas curvas para cada formulação, sendo uma ascendente e outra descendente. A curva ascendente é gerada quando há o aumento da taxa de cisalhamento, reduzindo a viscosidade dos sistemas. A curva descendente é formada quando diminui a taxa de cisalhamento, indicando que a viscosidade da formulação aumenta retornando ao seu estado inicial. Sendo assim, esses SLC também são classificados como tixotrópicos.

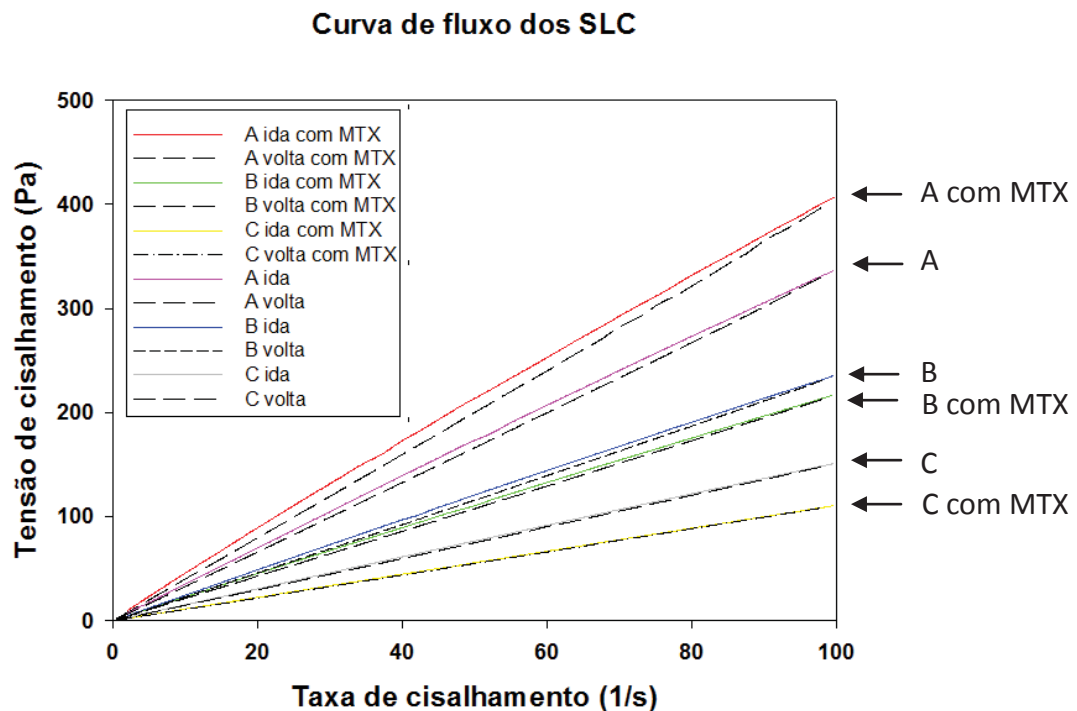
Tixotropia é uma alteração da viscosidade em função do tempo de deformação, sendo essa alteração representada pela perda da viscosidade do sistema. É um fenômeno reversível, visto que a viscosidade inicial retoma algum tempo após cessar a deformação. (ALMEIDA & BAHIA, 2003). Este fenômeno pode

ser observado quando a taxa de cisalhamento aumenta continuamente com o tempo de zero ao valor máximo e subsequentemente diminui para zero da mesma maneira (BARNES et al., 1989).

Entre as curvas, observam-se as áreas de histerese que se apresentaram bem pequenas indicando grande estabilidade do sistema, o que reduz a desorganização estrutural pelo efeito da tensão de cisalhamento.

Pôde-se verificar que a viscosidade das formulações teve decréscimo com a diminuição da quantidade de água entre os SLC, já que o aumento da quantidade de água torna a viscosidade maior.

A adição de MTX diminuiu a viscosidade das formulações, com exceção da A, em que a viscosidade aumentou com a adição do fármaco.

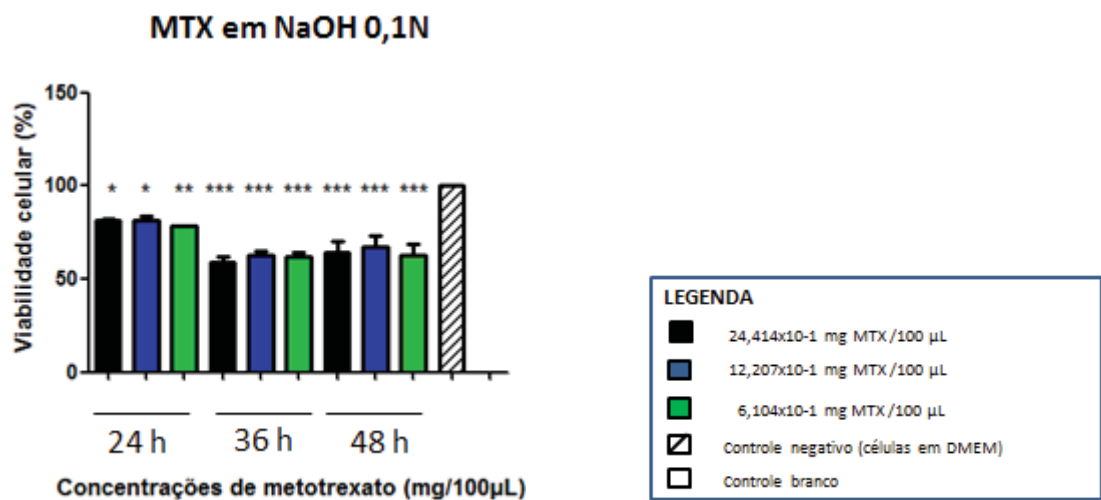


**Figura 9.** Curva de fluxo das formulações com e sem MTX dada pelo teste realizado no Rheostress RS1 rheometer, Haake, Karlsruhe, Germany, com o software Rheowin 3,5, com um sensor de geometria cone-placa de 40 mm de diâmetro, gap 52  $\mu\text{m}$  e ângulo 2°, à temperatura de 32°C.

#### 4.4 Ensaios de citotoxicidade

Através de resultados de viabilidade celular das formulações, elegeu-se as concentrações do fármaco no CL solubilizado em DMEM de  $24,414 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L,  $12,207 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L e  $6,104 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L, que, respectivamente, correspondem às seguintes diluições com DMEM: 1:512, 1:1024 e 1:2048. A diluição a partir de 1:512 foi escolhida, pois diluições menores acarretam em grande morte celular. A formulação sem o MTX, em diluições menores, também provocou grande morte.

Com os resultados de viabilidade celular das formulações e da solução de MTX, elaborou-se 4 gráficos contendo a viabilidade celular da linhagem HaCat tratada com as concentrações de MTX acima citadas por 24, 36 e 48 horas. Esses gráficos estão apresentados a seguir.

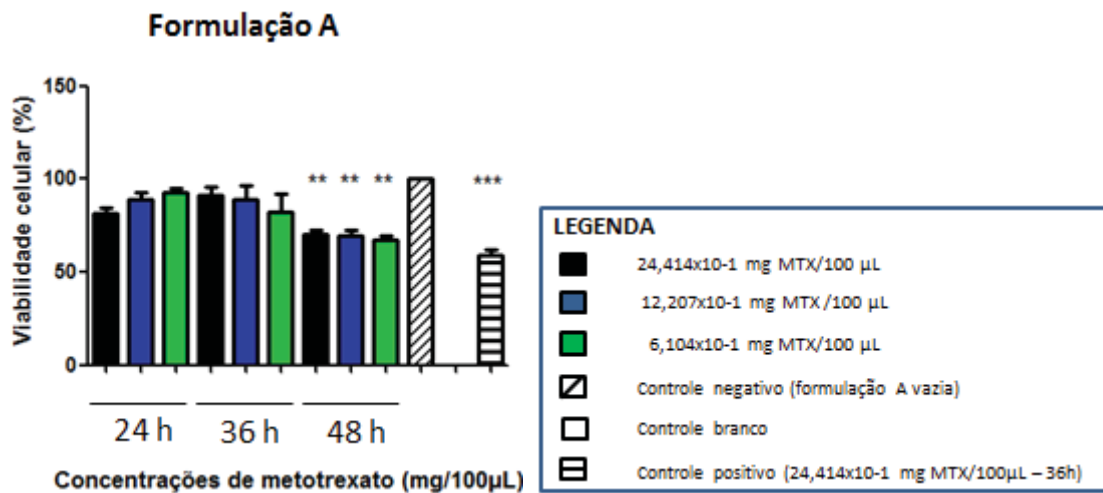


**Figura 10.** Porcentagem de viabilidade de células HaCat tratadas com soluções de MTX em NaOH 0,1 N por 24, 36 e 48 horas (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001).

A solução de MTX em NaOH 0,1 N (Fig. 10) apresentou-se como a mais citotóxica, visto que, todas as diluições em todos os tempos, possuem níveis de

significância, indicando que as soluções provocaram morte celular estatisticamente significativa comparada ao controle negativo.

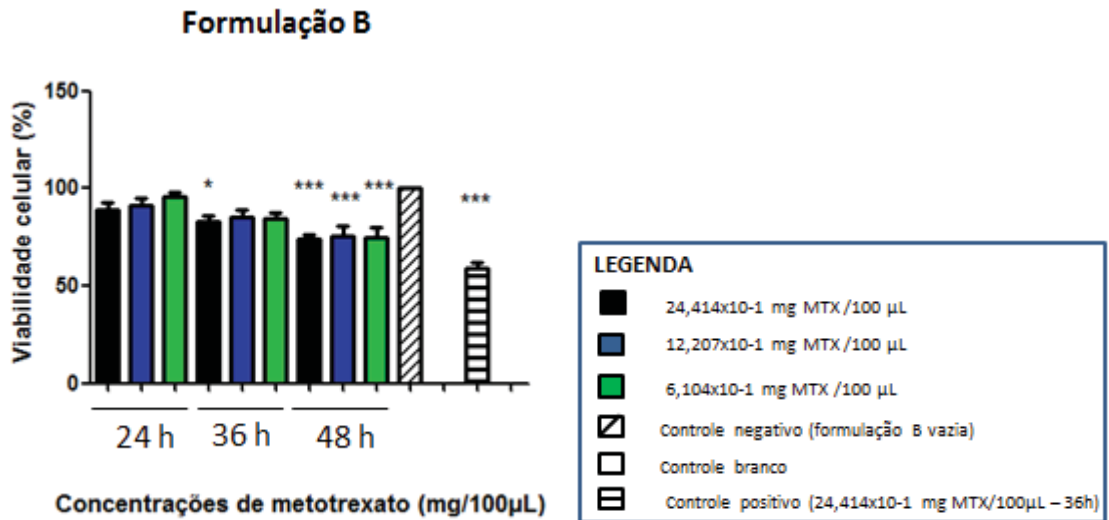
Pela Figura 10, observa-se que, à medida que as células ficam por um tempo maior em contato com a solução de MTX, a viabilidade das mesmas é menor comparada ao controle negativo, já que o nível de significância aumenta com o tempo de exposição. Estes resultados eram esperados, pois soluções convencionais não apresentam a capacidade de liberar o fármaco lentamente, sendo essa liberação imediata, provocando maior citotoxicidade. Além disso, observou-se que a diluição de  $24,414 \times 10^{-1}$  mg/100  $\mu$ L que tratou as células por 36 horas apresentou a maior citotoxicidade, então foi escolhida como controle positivo para os SLC.



**Figura 11.** Porcentagem de viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação A por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001).

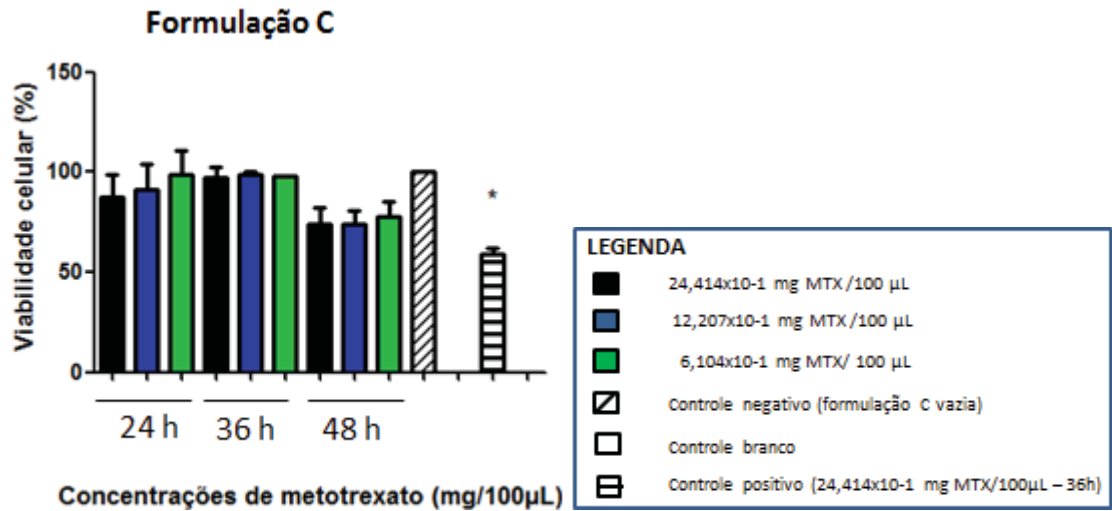
Conforme mostrado na Figura 11, a formulação A se apresentou viável nos tratamentos de 24 e 36 horas, porém em 48 horas, houve diferença estatística com 2

níveis de significância para as três diluições. Tal fato é explicado devido ao maior tempo de exposição, sendo assim, as células receberam maior quantidade de fármaco provocando aumento de morte celular.



**Figura 12.** Porcentagem de viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação B por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

Observando-se o gráfico da formulação B (Fig. 12), percebe-se que as células expostas por 36 horas à concentração de 24,414x10<sup>-1</sup> mg/100 µL apresentaram morte, visto que um nível de significância foi indicado. Além disso, essa formulação se comportou semelhante à formulação A, visto que também houve morte celular em 48 horas.



**Figura 13.** Porcentagem de viabilidade de células HaCat tratadas com diferentes concentrações de MTX na formulação C por 24, 36 e 48 horas. (\*: 0,05; \*\*: 0,01; \*\*\*: 0,001)

A princípio, a formulação C seria a mais tóxica por conter a maior quantidade de tensoativo, que provoca desorganização estrutural da membrana celular, permitindo maior passagem de fármaco (SCOGNAMIGLIO et al., 2012), levando à citotoxicidade, porém mostrou maior viabilidade (Fig. 13). Sugere-se que, quantidades maiores do tensoativo podem ter estruturado o MTX no arranjo lamelar do cristal, reduzindo a difusão do fármaco no sistema, garantindo uma liberação sustentada e, conseqüentemente, diminuindo a morte celular (LOPES, 2005).

## 5. Conclusão

Comparando-se os resultados da bioadesão da formulação contendo metotrexato com o padrão constituído por carbopol, conclui-se que as amostras testes possuem menor bioadesividade. Apesar de esses valores serem menores, não inviabilizam a aplicação tópica da formulação utilizada para o tratamento da psoríase.

As técnicas de microscopia de luz polarizada permitiram evidenciar a organização interna dos sistemas e classificá-los como líquido-cristalinos de fase lamelar.

Percebe-se dos ensaios reológicos que a formulação A foi elegida como melhor para aplicação tópica, por apresentar maior viscosidade, uma vez que o fármaco fica mais estruturado na formulação, permanecendo mais tempo em contato com a pele.

Os ensaios de citotoxicidade sugerem maior segurança na utilização de sistemas líquido-cristalinos em relação aos controles, sobretudo da formulação C, que, possivelmente, permitiu liberação lenta de fármaco, contribuindo com maior viabilidade celular.

## **6. Referências bibliográficas**

- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmet. Toiletries*, v. 15, n. 3, p.96-100, 2003.
- ANDREW, L.B., RICHARE, A.B., JEFFREY, W.H., MARK, P.L. Emerging therapeutic targets in psoriasis. *Curr. Opin. Pharmacol*, v.4, p.306–310, 2004.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR. L. V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, p.288-291, 2000.
- ARCHONDO A. E. D. L. *Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo extrato de Centella asiática L. (Urban)*. [Tese] Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. 2003.
- BARAUSKAS J., JOHNSON M., TIBERG F. Self-assembled lipid superstructures: beyond vesicles and liposomes, *Nano. Lett*, v.5, n.8, p.1615 e 1619, 2005.

- BARNES H.A., HUTTON J.F., WALTER K. An Introduction to Rheology, Elsevier, New York, 1989.
- BATCHELOR, J.M.; INGRAM, J.R.; WILLIAMS, H. Adalimumab vs methotrexate for the treatment of chronic plaque psoriasis. Arch Dermatol., v.145, n.6, p.704-706, 2009.
- BÉRARD, F.; NICOLAS, J.F. Physiopathologie du psoriasis Ann. Dermatol. Venereol, v.130, p.837-842, 2003.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R. T., BREITKREUTZ, D., HORNUNG, J., MARKHAM, A. and FUSENIG, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J. Cell Biol, v. 106, 761-771, 1988.
- CARRASCOSA, J.M.; VANACLOCHA, F.; BORREGO, L.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, E.; FUERTES, A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ-FREIRE, L.; ZULAICA, A.; TUNEU, A.; CABALLÉ, G.; COLOMÉ, E.; BORDAS, X.; HERNANZ, J.M.; BRUFAU, C.; HERRERA, E. Update of the topical treatment of psoriasis. Actas Dermosifiliogr., v.100, n.3, p.190-200, 2009.
- CARRETERO G., PUIG L., DEHESA L., CARRASCOSA J. M., RIBERA M., SÁNCHEZ-REGAÑA M., DAUDÉN E., VIDAL D., ALSINA M., MUÑOZ-SANTOS C., LÓPEZ-ESTEBARANZ J. L., NOTARIO J., FERRANDIZ C., VANACLOCHA F., GARCÍA-BUSTINDUY M., TABERNER R., BELINCHÓN I., SÁNCHEZ-CARAZO J., MORENO J. C. y Grupo de Psoriasis de la AEDV. Metotrexato: guía de uso em psoriasis. Actas Dermosifiliogr, v.101, n.7, p.600–613, 2010.
- CARVALHO F.C., BRUSCHI M. L., EVANGELISTA R. C., GREMIÃO M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 46, n. 1, 2010.



- CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.
- CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química Nova*, v.32, n.4, p.1036-1040, 2009.
- CLARKE, L.E., JUNKINS-HOPKINS, J.; SEYKORA, J.T.; ADLER, D.J.; ELENITSAS, R. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis presenting in the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.56, n.4, p.686-690, 2007.
- DARABI, K.; JAISWAL, R.; HOSTETLER, S.; BECHTEL, M.; ZIRWAS, M. Infectious complications in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis treated with antitumor necrosis factor agents and methotrexate. *J. Drugs Dermatol.*, v.8, n.2, p.175-178, 2009.
- Deyrieux A. F., Wilson V. G. *In vitro* culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, v.54, n.2, p. 77–83, 2007.
- FARKAS, E.; KISS, D.; ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. *Int. J. Pharm.*, v.340, n.1-2, p.71-75, 2007.
- Farokhzad O., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano* v.3, n.1, p.16-20, 2009.

- FRANK, C.S., ALAN, M.M. Methotrexate and psoriasis in the era of new biologic agents. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.50, p.301–309, 2004.
- FRESHNEY R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Ed.5, p.370, 2005.
- GRIFFITHS, C.E.M.; CAMP, R.D.R.; BARKER, J.N.W.N BURNS, T.; BREATHNACH, S.N.; COX, N.; GRIFFITHS, C.E.M. Psoriasis. In: *Textbook of Dermatology*. Ed.7. Blackwell Science: London, p.35.1-35.69, 2005.
- GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. *Drug Target Insights*, v.2, p.147-157, 2007.
- HOPER, J. Spectrophotometric in vivo determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiol. Meas*, v. 18, p.61–66, 1997.
- JACOBI U., KAISER M., TOLL R., MANGELSDORF S., AUDRING H., OTBERG N., STERRY W., LADEMANN J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. *Skin Res. Technol.*, v.13, p.19–24, 2007.
- JOHNSSON, M.; BARAUSKAS, J.; NORLIN, A.; TIBERG, F. Physicochemical and drug delivery aspects of lipid-based liquid crystalline nanoparticles: a case study of intravenously administered propofol. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v.6, n.9-10, p.3017- 3024, 2006.
- JOHNSTON A., GUDJONSSON J. E., SIGMUNDSDOTTIR H., LUDVIKSSON B. R., VALDIMARSSON H. The anti-inflammatory action of methotexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin. Immunol.*, v.114, p.154–63, 2005.

- KALB, R.E.; STROBER, B.; WEINSTEIN, G.; LEBWOHL, M. Methotrexate and psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. J. Am. Acad. Dermatol., v.60, n.5, p.824-837, 2009.
- KRUGER G, KOO J, LEBWOHL M., MENTER A, STERN R. S., ROLSTAD T., et al. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. Arch Dermatol., v.137, p.280-284, 2001.
- KRUEGER J. C., BOWCOCK A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. Ann Rheum Dis, 64(Suppl 2), p.30-36, 2005.
- LAGERWALL J. P. F., SCALIA G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology, Current Applied Physics, v.12, n.6, p.1387-1412, 2012
- LEE, K.W.; NGUYEN, T.H.; HANLEY, T.; BOYD, B.J. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines *in vitro* sustained release and *in vivo* oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. Int. J. Pharm., v.365, n.1-2, p.190-199, 2009.
- LI, P.; HYNES, S.R.; HAEFELE, T.F.; PUDIPEDDI, M.; ROYCE, A.E.; SERAJUDDIN, A.T. Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion preconcentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug. J. Pharm. Sci., v.98, n.5, p.1750-1764, 2009.
- LOPES, L. B., Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação e moléculas carreadoras. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, 2005.

- MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R.  
Formulário Dermocosmético. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade , v. 2,  
p.37-38, 1999.
- MALMSTEN M., Soft drug delivery systems, *Soft Matter*, v.2, n.9, p.760-769, 2006.
- MARTINS, G.A.; ARRUDA, L. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte I:  
metotrexato e acitretina. *An. Bras. Dermatol.*, v.79, n.3, p.263-278, 2004.
- Mendonca, C.O., Burden, A.D. Current concepts in psoriasis and treatment.  
*Pharmacol. Therapeut.*, v.99, p.133–137, 2003.
- MENTER, A.; KORMAN, N.J.; ELMETS, C.A.; FELDMAN, S.R.; GELFAND, J.M.;  
GORDON, K.B.; GOTTLIEB, A.B.; KOO, J.Y.; LEBWOHL, M.; LIM, H.W.; VAN  
VOORHEES, A.S.; BEUTNER, K.R.; BHUSHAN, R. Guidelines of care for the  
management of psoriasis and psoriatic arthritis Section. Guidelines of care for the  
management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *J. Am.  
Acad. Dermatol.*, v.17, p.152-163, 2009.
- MENTER A., GOTTLIEB A., FELDMAN S. R., VAN VOORHEES A. S., LEONARDI  
C. L., GORDON K.B., 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-  
850, 2008.
- MEZZENGA R., SCHURTENBERGER P., BURBIDGE A., MICHEL M.  
Understanding foods as soft materials, *Nat. Mater*, v.4, n.10, p.729-740, 2005.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of  
Pharmaceutical Research*, v.5, n.1, p.561-573, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, v.65, p.55–63, 1983.

MULLER-GOYMANN C., Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.58, n.2, p.343 e 356, 2004.

NALDI, L.; RAHO, G. Emerging drugs for psoriasis. *Expert Opin Emerg Drugs*, v.14, n.1, p.145-163, 2009.

NÉMETH Z.S., HALÁSZ L., PÁLINKÁS J., BÓTA A., HORÁNYI T., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.145, p.107, 1988.

ROGERO S. O., LUGÃO A. B., IKEDA T. I., CRUZ A. S., *Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. Materials Research*, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B*, v.764, p.217-254, 2001.

SANTOS, O.D.H.; MIOTTO, J.V.; MORAIS, J.M.; ROCHA-FILHO, P.A.; OLIVEIRA, W.P. Attainment of emulsions with liquid crystals from marigold oil using the required HLB method. *J. Dispersion Sci. Technol.*, v.26, p.243-249, 2005.

SAGALOWICZ L., LESER M., WATZKE H., MICHEL M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles, *Trends. Food Sci. Tech.*, v.17, n.5, p.204-214, 2006.

SAVIC S., VULETA G., DANIELS R., MULLER-GOYMANN C. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside nonionic emulsifier, *Colloid Polym. Sci.*, v.283, n.4, p. 439-451, 2005.

- SEKKAT N., KALIA Y. N., Guy R.H.. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. J. Pharm. Sci., v.91, p.2376–2381, 2002.
- SCHOTT, H. Reologia. In: Remington Pharmacia. 19. ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, p. 426-455, 1995.
- SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: Artliber Editora, ed.2, 2006.
- SCOGNAMIGLIO I., DE STEFANO D., CAMPANI V., MAYOL L., CARNUCCIO R., FABBROCINI G., AYALA F., LA ROTONDA M. I., DE ROSA G. Nanocarriers for topical administration of resveratrol: A comparative study. International Journal of Pharmaceutics, 2012.
- SIGMUNSDOTTIR H., JOHNSTON A., GUDJONSSON J.E., BJARNASON B, VALDIMARSSON H. Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the numbers of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. Exp Dermatol., v.13, p.426–434, 2004.
- SIZTO, S.; BANSBACK, N.; FELDMAN, S.R.; WILLIAN, M.K.; ANIS, A.H. Economic evaluation of systemic therapies for moderate to severe psoriasis. Br. J. Dermatol.,v.160, n.6, p.1264-1272, 2009.
- SPICER P. Progress in liquid crystalline dispersions: cubosomes, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., v.10, n.5 e 6, p.274-279, 2005.
- THIRAWONG N., NUNTHANID J., PUTTIPIPATKHACHORN S., SRIAMORNSAK P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.67, n.1, p.132-140, 2007.
- THIELEN, A.M.; LAFFITTE, E. Topical treatments for psoriasis in 2009. Rev. Med. Suisse, v.5, n.200, p.876-881, 2009.

- TORRES-ÁLVAREZ B., CASTANEDO-CAZARES J.P., FUENTES-AHUMADA C., MONCADA B. The effect of methotrexate on the expression of cell adhesion molecules and activation molecule CD69 in psoriasis. *J. Eur.Acad. Dermatol. Venereol*, v.21, p.334–339, 2007.
- WARREN R. B., GRIFFITHS C. E. M. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin. Dermatol.*, v.26, p.438–44, 2008.
- YAGHMUR A., GLATTER O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions, *Adv. Colloid Interface Sci.*, v.147 e 48, p.333-342, 2009.